UNTERSUCHUNGEN ZUM CHINONMETABOLISMUS IN DER RATTENLEBER: MESSUNG DER ULTRASCHWACHEN CHEMILUMINESZENZ BEI OXIDATIVER BELASTUNG DURCH MENADION

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Heribert Wefers
aus Krefeld

Düsseldorf 1985

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543905_0111

UNTERSUCHUNGEN ZUM CHINONMETABOLISMUS IN DER RATTENLEBER:

MESSUNG DER ULTRASCHWACHEN CHEMILUMINESZENZ BEI OXIDATIVER BELASTUNG DURCH MENADION

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Heribert Wefers
aus Krefeld
Düsseldorf 1985

Referent: Prof. Dr. H. Sies
Korreferent: Prof. Dr. D. Riesner

Tag der mündlichen Prüfung: 29. Januar 1985

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	Abkürzungen	1
2.	Einleitung	2
2.1.	Chinone, Vorkommen und Bedeutung	2
2.2.	Zelluläre Reduktion und Redox-Cycling	3
2.3.	Superoxid und andere reaktive Sauerstoffmetaboliten	6
3.	Materialien und Methoden	10
3.1.	Chemikalien und Enzyme	10
3.2.	Versuchstiere und Vorbehandlung	10
3.3.	Perfusion der Rattenleber	11
3.4.	Präparation der Hepatocyten	11
3.5.	Präparation der Mikrosomenfraktion	12
3.6.	Präparation des postmitochondrialen Überstandes von Mäuselebern (S 9)	12
3.7.	Bestimmung des intrazellulären Glutathion- und $NADP^+$-Gehaltes	13
3.8.	Messung der NAD(P)H-Chinon-Reduktase-Aktivität	13
3.9.	Superoxid-produzierende Modellsysteme	13
3.10.	Bestimmung des Glutathiondisulfids mittels Hochdruck-flüssigkeitschromatographie	13
3.11.	Chemilumineszenzmesung	14
4.	Ergebnisse	18
4.1.	Charakterisierung der menadionabhängigen Chemilumineszenz in der perfundierten Rattenleber, in isolierten Hepatocyten und in Zellfraktionen	18
4.1.1.	Menadionabhängige Chemilumineszenz und Oxidation des zellulären Glutathions und NADPHs	18
4.1.2.	Verringerung der menadionabhängigen Chemilumineszenz durch Senkung des zellulären Glutathiongehaltes	23
4.1.3.	Nachweis des Redox-Cyclings des Menadion-Glutathion-Konjugates: Messung der Chemilumineszenz und des Sauerstoffverbrauchs	23

4.1.4. Effekt der Hemmung der NAD(P)H-Chinon-Reduktase 30
4.1.5. Effekt der Induktion der NAD(P)H-Chinon-Reduktase durch das Antioxidans butyliertes Hydroxyanisol (BHA) 34
4.1.6. Beeinflussung der menadionabhängigen Chemilumineszenz durch Atmungskettenblocker und durch Hemmung der mitochondrialen Pyridinnukleotidtranshydrogenase 40
4.1.7. Hemmung der UDP-Glucuronyltransferase und der PAPS-Sulfotransferase 46
4.2. Zum Mechanismus der Chemilumineszenzentstehung: Modellversuche mit Superoxid-produzierenden Systemen 51
4.2.1. Chemilumineszenz während der Xanthinoxidasereaktion und während der Autoxidation eines Hydrochinons 52
4.2.2. Superoxid-produzierende Modellsysteme in Gegenwart von GSH 59
4.2.3. Nachweis der Reaktion des Superoxids mit reduziertem Glutathion (GSH) 60
4.2.4. Superoxid-abhängige Oxidation des GSH zu GSSG 62
4.2.5. Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs durch GSH 64
4.2.6. Superoxid-abhängige Chemilumineszenz in Gegenwart von GSH 64
4.2.7. Hemmung der GSH-abhängigen Chemilumineszenz 74
4.2.8. Zum Mechanismus der Reaktion von Superoxid mit GSH 76
5. Diskussion 79
5.1. Chemilumineszenzmessungen am perfundierten Organ, an isolierten Hepatocyten und Mikrosomenfraktionen als eine Methode zur qualitativen Erfassung des Menadionmetabolismus 79
5.2. Zum Mechanismus der Chemilumineszenzentstehung 84
6. Zusammenfassung 88
7. Literaturverzeichnis 90

1. Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
DNFB	2,4-Dinitrofluorbenzol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GSH	Glutathion, reduzierte Form
GSSG	Glutathiondisulfid
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid, reduziert
$NADP^+$	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat, oxidiert
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat, reduziert
SOD	Superoxiddismutase
$^1O_2$	Singulettsauerstoff
UDP	Uridindiphosphat

2. EINLEITUNG

2.1. Chinone, Vorkommen und Bedeutung

Chinone, chemisch nichtaromatische Diketone, sind eine Substanzgruppe, deren Vertreter in großer Vielzahl sowohl in Pflanzen als auch im Tierreich zu finden sind. Ein Beispiel stellen die Ubichinone dar, so genannt aufgrund ihrer ubiquitären Verbreitung, welche eine Rolle beim Elektronentransport in der mitochondrialen Atmungskette spielen. Eine entsprechende Funktion besitzen die Plastochinone bei der Photosynthese; auch hier wird die Fähigkeit der Chinone, reversibel Elektronen aufzunehmen - über die später noch ausführlich zu sprechen sein wird - in einem Prozeß der sukzessiven Weitergabe von Reduktionsäquivalenten genutzt. Auch eine Reihe pflanzlicher Farbstoffe sind Chinone, wie z.B. das gelbe Pigment des Henna-Strauches, Lawson (2-Hydroxy-1,4-Naphthochinon) oder das Alizarin (2,3-Dihydroxy-1,6-Anthrachinon). Das Vitamin K_1 (2-Methyl-3-phytyl-1,4-naphthochinon), als ein Beispiel für Naphthochinonderivate in tierischen Zellen, spielt eine wesentliche Rolle im Prozeß der Blutkoagulation. (Zur Verbreitung der Chinone in der Biologie siehe auch Thomson, 1971.)

Chinonderivate erlangen eine wachsende Bedeutung als Therapeutika. Als Beispiele seien hier Lapachol, sowie Adriamycin (Doxorubicin), Mitomycin und Streptonigrin genannt.

Eine Reihe von Chinonen zeigt mutagene und karzinogene Wirkung, darunter befinden sich einige Substanzen, die mit der menschlichen Nahrung aufgenommen werden (Moore und Czerniak, 1981; Brown, 1980) sowie auch Umweltgifte, die vor allem bei der Verbrennung organischen Materials entstehen (z.B. Benzpyrenchinon im Zigarettenrauch (Pryor et al., 1982) oder im Abgas von Dieselmotoren (Schuetzle, 1983) und auch auf athmosphärischen Staubteilchen nachgwiesen wurden (Fox und Olive, 1979). In diesem Zusammenhang sind außerdem Substanzen zu nennen, die erst in der Zelle zu wirksamen Agentien umgesetzt werden. So konnte im

Fall des 1-Naphthols eine selektive Wirkung auf Tumoren gezeigt werden (Cohen et al, 1983); dabei wird die mikrosomale Umsetzung des Naphthols zu 1,2- und 1,4-Naphthochinon als Ursache für die Wirkung des 1-Naphthols diskutiert (Thornalley et al, 1984).

2.2. Zelluläre Reduktion und Redox-Cycling

Die Reduktion exogener Chinone kann enzymatisch oder nichtenzymatisch erfolgen, sie kann mit der Übertragung eines einzelnen Elektrons verbunden sein und damit zum Semichinonradikal führen oder in einem Zwei-Elektronenschritt ohne Auftreten eines freien Semichinons direkt zur Bildung der Hydrochinon- bzw. Dihydroxyform führen.

Die enzymatische oder nichtenzymatische Reduktion von Chinonen zum Semichinonradikal, welchem als Produkt der Ein-Elektronen-Reduktion aufgrund seiner hohen Reaktivität eine große Bedeutung zukommt, stellt eine Voraussetzung für zwei Mechanismen dar, welche den weitaus größten Teil der toxischen und/oder therapeutischen Wirkungen von Chinonen erklären. 1. Das Semichinonradikal reagiert direkt mit zellulären Bestandteilen wie DNA (Moore und Czerniak, 1981; Morimoto et al, 1983), und bewirkt dadurch die cytotoxische Wirkung oder Mutagenität. 2. Das Semichinonradikal reagiert mit molekularem Sauerstoff, welcher dadurch zum Superoxidanionradikal $O_2^{-\cdot}$ bzw. zu dessen protonierter Form $HO_2^{\cdot}$ umgesetzt wird. Die (möglicherweise fortgesetzte) Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies und deren Folgeprodukte ist verantwortlich für eine Reihe von cytotoxischen Reaktionen, die später beschrieben werden (siehe auch Kappus und Sies, 1981).

In dieser Arbeit werde ich mich auf die Beschreibung und Diskussion derjenigen Effekte beschränken, die im Zusammenhang mit sauerstoffabhängigen Reaktionen zu beobachten sind, sodaß auf toxische Wirkungen aufgrund der direkten Reaktion der Semichinone mit zellulären Komponenten nicht eingegangen wird.

Die enzymatische Bildung des Semichinons wurde für das mikrosomale Enzym NADPH-Cytochrom P-450-Reduktase und für eine Vielzahl von Substraten beschrieben, darunter p-Benzochinon, Menadion (Iyanagi und Yamazaki,

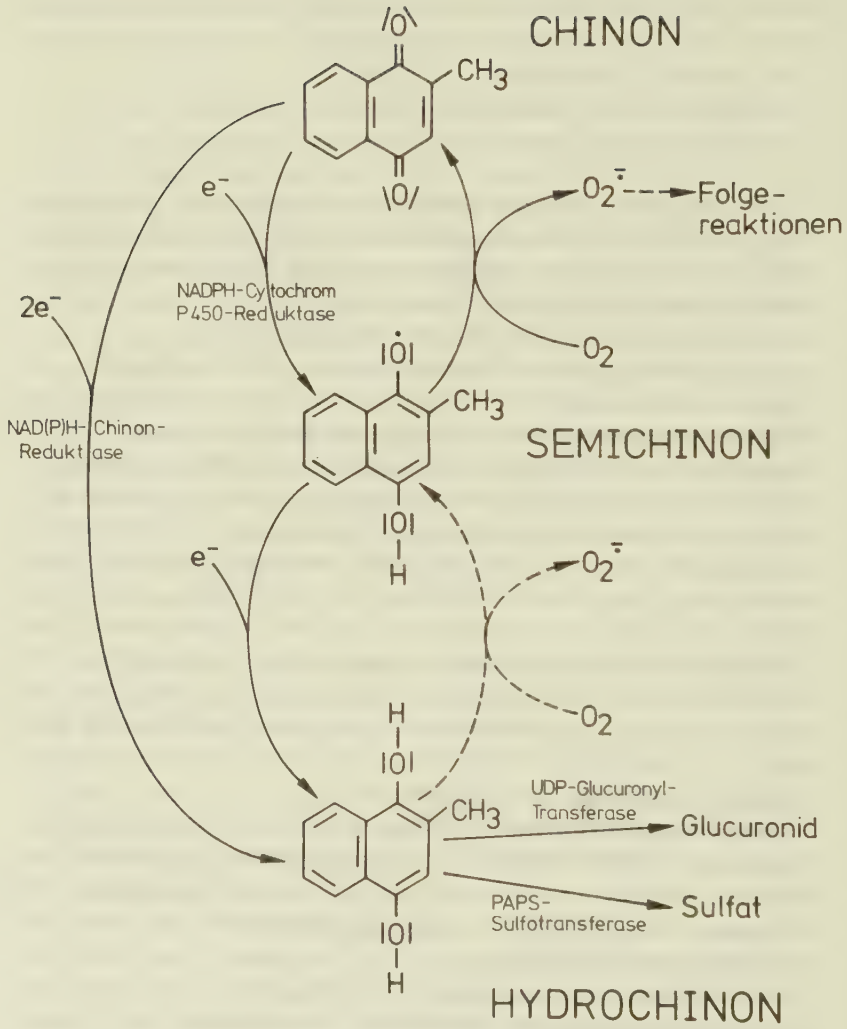

CHINON
CH3
e⁻
O2⁻ --- Folge-reaktionen
NADPH-Cytochrom P450-Reduktase
2e⁻
O2
NAD(P)H-Chinon-Reduktase
SEMICHINON
e⁻
O2⁻
O2
UDP-Glucuronyl-Transferase
Glucuronid
PAPS-Sulfotransferase
Sulfat
HYDROCHINON

Abbildung 1. Schematische Darstellung des Menadionmetabolismus in der Leberzelle. Die Ein-Elektron-Reduktion kann nicht nur durch die NADPH-Cytochrom P450-Reduktase, sondern auch durch die NADH-Ubichinon-Reduktase oder nichtenzymatisch erfolgen. Die NAD(P)H-Chinon-Reduktase (DT-Diaphorase, EC 1.6.99.2) katalysiert die Zwei-Elektronen-Reduktion , sie kann spezifisch durch Dicoumarol gehemmt werden. Salicylamid inhibiert sowohl die UDP-Glucuronyltransferase (EC. 2.4.1.17) als auch die PAPS-Sulfotransferase (EC.2.8.2.1). Die Aktivität der PAPS-Sulfotransferase kann über die Konzentration des anorganischen Sulfats gesteuert werden.

1970), 2,5-Dimethyl- und 2,3,5-Trimethyl-p-Benzochinon und Durochinon (Powis und Appel, 1980). Auch die mitochondriale NADH Dehydrogenase katalysiert diese Reaktion, neben dem Coenzym Q wurden unter anderem p-Benzochinon und Menadion als Substrate beschrieben. Als weitere Enzyme sind Cytochrom b_5 Reduktase, Ferredoxin NADPH Reduktase und Succinat Dehydrogenase zu nennen (Iyanagi und Yamazaki, 1970). Es wurde darüberhinaus gezeigt, daß einige Enzyme, im Gegensatz zu den obengenannten, typischerweise Zwei-Elektronen-Reduktionen katalysieren, wobei im Hinblick auf die hier interessierenden Chinone die NAD(P)H-Chinon-Oxidoreduktase (EC. 1.6.99.2) von Interesse ist. Dieses Enzym, welches z.B. Menadion und p-Benzochinon unter NADH- oder NADPH-Verbrauch ohne Bildung eines Semichinons direkt zum Hydrochinon reduziert, wurde auch als DT-Diaphorase bezeichnet und wurde von Ernster (1967) für Benzochinon- und Naphthochinonderivate sowie für Ubichinon als Substrat beschrieben.

Die bereits erwähnte Reaktion des Semichinons mit molekularem Sauerstoff unter Bildung des Superoxidradikal-Anions führt wieder zum Chinon, welches dann erneut reduziert werden kann. Dieser Zyklus der fortgesetzten Reduktion/Oxidation ist mit einem hohen Verbrauch an Reduktionsäquivalenten sowie einer kontinuierlichen Produktion von

Superoxid verbunden. Dieser Prozeß wird als Redox Cycling bezeichnet. Die damit verbundene beträchtliche oxidative Belastung kann als ein entscheidender Faktor der Chinontoxizität betrachtet werden (Kappus und Sies, 1981).

Es soll hier darauf hingewiesen werden, daß Chinone im vollständig reduzierten Zustand (z.B. Menadiol) ebenfalls mit molekularem Sauerstoff reagieren und dabei Superoxid produzieren, allerdings ist deren Reaktivität wesentlich geringer. Darüberhinaus sind Hydrochinone aufgrund ihrer stärker polaren Gruppen im Gegensatz zu Chinonen Substrate für enzymatische Entgiftungsreaktionen, wie z.B. die Glucuronidierung und die Sulfatierung. Das heißt, daß die direkte Reduktion zum Hydrochinon (ohne freies Semichinon) nicht als toxischer Weg zu betrachten ist; so konnte im Gegenteil für Menadion gezeigt werden, daß eine Inhibierung der Zwei-Elektronen-Reduktion die Toxizität drastisch erhöht (Thor et al., 1982). Auch für andere Naphthochinone wurde eine Schutzfunktion der Zwei-Elektronen-Reduktion durch die NAD(P)H-Chinon-Oxidoreduktase gezeigt (d'Arcy Doherty et al., 1983). Eine schematische Übersicht über den Metabolismus des hier als Modellsubstanz gewählten Chinons, Menadion (2-Methyl-1,4-Naphthochinon), ist in Abbildung 1 wiedergegeben.

2.3. Superoxid und andere reaktive Sauerstoffmetaboliten

Das Superoxidanion $O_2^{-\cdot}$ ist ein Radikal mit beträchtlicher biologischer Bedeutung, welches bei einer Vielzahl von enzymatischen und nichtenzymatischen Reaktionen entsteht. Als wichtigster Schutz gegen das Superoxidanionradikal $O_2^{-\cdot}$ ist das Enzym Superoxiddismutase zu nennen, welches die Dismutation

$$O_2^{-\cdot} + O_2^{-\cdot} + 2\,H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2 \qquad (1)$$

katalysiert. Die stationäre Konzentration des Superoxids in der Zelle wurde auf die Größenordnung 10^{-12} bis 10^{-11} M geschätzt (Fridovich, 1983). Die Dismutation erfolgt auch nichtenzymatisch, jedoch um Größenordnungen langsamer und als Reaktion zweiter Ordnung, d.h. vor allem bei niedrigen Konzentrationen des Superoxids ist dessen erste Halbwertszeit relativ groß (Fridovich, 1983). Schutzfunktionen im Hinblick auf das

gebildete H_2O_2 besitzen insbesondere Katalase und Glutathionperoxidase (Reaktionen 2,3):

$$2\ H_2O_2 \xrightarrow{\text{Katalase}} 2\ H_2O + O_2 \qquad (2)$$

$$H_2O_2 + 2\ GSH \xrightarrow{\text{GSH Peroxidase}} 2\ H_2O + GSSG \qquad (3)$$

Das Glutathiondisulfid wird in einer weiteren Reaktion mit Hilfe der Glutathion-Reduktase unter Verbrauch von Reduktionsäquivalenten (NADPH) wieder reduziert. Wird die Kapazität der genannten Enzyme überschritten oder deren Funktion anderweitig gestört, sodaß die Sauerstoffmetaboliten und ihre Folgeprodukte nicht mehr eliminiert werden können, kann von oxidativem Streß gesprochen werden. Im Folgenden sollen einige derjenigen Faktoren diskutiert werden, die dabei sowie bei der damit verbundenen Sauerstofftoxizität eine Rolle spielen.

Das Superoxidanion ist ein relativ reaktionsträges Radikal; Messungen seiner Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten für die Reaktionen mit einigen zellulären Bestandteilen ergab sehr niedrige Werte, so z.B. für die Reaktion mit Metaboliten des Citratzyklus (Bielski und Richter, 1977) oder mit einigen Aminosäuren (Bielski und Shiue, 1979). Von den 21 untersuchten Aminosäuren lag die obere Grenze für k bei 24,0 M^{-1} x s^{-1}(Bielski und Shiue, 1979). Auch die direkte Reaktion von $O_2^{-\cdot}$ mit ungesättigten Fettsäuren konnte nicht gezeigt werden, allerdings die Reaktion mit α-Tocopherol, Lipidhydroperoxiden, Adrenalin, 6-Hydroxydopamin, Katecholen u.a. (Fridovich, 1983). Die Verhältnisse sind etwas anders bei der protonierten Form des Superoxids $HO_2^{\cdot}$, welche mit $O_2^{-\cdot}$ in wässriger Lösung mit einem pK von 4,7 im Gleichgewicht vorliegt (Bielski, 1978). $HO_2^{\cdot}$ ist ein im Vergleich zum $O_2^{-\cdot}$ relativ starkes Oxidans. Es reagiert z.B. mit ungesättigten Fettsäuren (k etwa 300 M^{-1} x s^{-1} für Linolsäure und Arachidonsäure (Gebicki und Bielski, 1981)), und mit einigen Aminosäuren wie Cystein ($k \leq 601\ M^{-1} \times s^{-1}$) und l-Phenylalanin ($k \leq 180\ M^{-1} \times s^{-1}$), im Vergleich dazu zeigt es sich gegenüber der Mehrzahl der Aminosäuren nur wenig reaktiv (Bielski und Shiue, 1979). Normalerweise liegt $HO_2^{\cdot}$ bei physiologischem pH in einem relativ niedrigen Prozentsatz vor, allerdings muß letzteres nicht zwangsläufig der Fall sein: Die Ionisation der neutralen Säure $HO_2^{\cdot}$ ist in einer Umgebung mit hoher Dielektrizitätskonstanten begünstigt, umgekehrt wird der Wert

des pK größer, wenn die Dielektrizitätskonstante kleiner wird (siehe auch Fridovich, 1983), d.h. daß das Superoxid in nichtwässriger Umgebung (Membranen, Lipidvesikel oder innerhalb globulärer Proteine) eher in der protonierten Form vorliegt. Daher sollte bei der Diskussion um superoxidabhängige Reaktionen die relativ höhere Reaktivität des $HO_2^{\cdot}$ in Betracht gezogen werden.

Das im Vergleich zu $O_2^{-\cdot}$ und $HO_2^{\cdot}$ sehr viel reaktivere Hydroxylradikal $OH^{\cdot}$ kann bei der Reaktion des Superoxids mit H_2O_2, welches z. B. durch Dismutation des Superoxids entsteht, gebildet werden. Die von Haber und Weiss zuerst beschriebene und nach ihnen benannte Reaktion wird durch komplexiertes Eisen (McCay et al, 1976) aber auch durch andere Metallionen, wie z.B. Cu^{2+} katalysiert.

$$O_2^{-\cdot} + H_2O_2 \longrightarrow OH^{\cdot} + OH^{-} + O_2 \qquad (4)$$

Das Hydroxylradikal kann als enorm starkes Oxidans neben Additions- und Elektronenübertragungsreaktionen H-Atome abstrahieren und damit zum Initiator für Radikalkettenreaktionen werden, wie im Fall der Lipidperoxidation:

$$LH + OH^{\cdot} \longrightarrow L^{\cdot} + H_2O \qquad (5)$$

$$L^{\cdot} + O_2 \longrightarrow LOO^{\cdot} \qquad (6)$$

$$LOO^{\cdot} + LH \longrightarrow L^{\cdot} + LOOH \qquad (7)$$

Als Schutz sind hier Antioxidantien wie α-Tocopherol und Glutathion im Zusammenhang mit dem Glutathionperoxidasesystem zu nennen. Aufgrund ihrer hohen Reaktivität sind die Wirkungen der $OH^{\cdot}$-Radikale weitgehend auf die unmittelbare Umgebung ihres Entstehungsortes beschränkt.

Eine weitere reaktive Sauerstoffspezies ist eine angeregte Form molekularen Sauerstoffs, Singulettsauerstoff ($^1O_2$). Neben einer Vielzahl chemischer und photochemischer Reaktionen, welche Singulettsauerstoff erzeugen, tritt Singulettsauerstoff auch in biologischen Systemen auf. So konnte er als Produkt der Selbstreaktion von Lipidperoxiradikalen nach dem von Russell (1957) beschriebenen Mechanismus nachgewiesen werden. Auch die Bildung angeregter Carbonyle ist dabei möglich; die Entstehung von 1,2-Dioxetanen bei Lipidperoxidationsreaktionen oder die Reaktion von Singulettsauerstoff mit Doppelbindungen wird als Ursache

beschrieben (Foote, 1976). Unter bestimmten Bedingungen korrelierte die Messung angeregter Spezies (Chemilumineszenz) mit der Lipidperoxidation, wenn diese mittels anderer Parameter (Malondialdehyd, Alkane) gemessen wurde (Smith et al, 1981; Cadenas et al, 1981).

Auch die als (4) beschriebene Haber- Weiss-Reaktion wird als mögliche Quelle für Singulettsauerstoff genannt (Kellogg und Fridovich, 1975), ebenso wird die Bildung von $^1O_2$ bei der Reaktion von Superoxid mit $OH^{\cdot}$-Radikalen vorgeschlagen (z.B. Arneson, 1970) und aus thermodynamischen Gründen für möglich gehalten (Koppenol, 1978). Die Frage, ob die nichtenzymatische Dismutation von Superoxid zur Bildung von $^1O_2$ führt, wird kontrovers diskutiert (Khan, 1970; Mayeda und Bard, 1974; Foote et al, 1980); die berichteten Ergebnisse sind z.T. unter sehr unterschiedlichen Bedingungen und mit sehr unterschiedlichen Methoden gewonnen worden, sodaß nicht klar ist, ob unter physiologischen Bedingungen diese Möglichkeit der $^1O_2$-Enstehung von Bedeutung ist. (Siehe dazu auch die Diskussion, S.84.)

Die Enstehung angeregter Moleküle wie $^1O_2$ bietet die Möglichkeit, über die Messung der beim Übergang in den Grundzustand emittierten Photonen als ultraschwache Chemilumineszenz Aussagen über das Fließgleichgewicht dieser angeregten Moleküle machen zu können, und zwar auch in intakten Zellen und Geweben. In der vorliegenden Arbeit wurde diese nichtinvasive und kontinuierlich einsetzbare Methode angewandt bei der isoliert perfundierten Rattenleber, isolierten Hepatozyten, Zellfraktionen und bei Modellreaktionen. Ziel war es, den zellulären Metabolismus der Chinone über die Messung angeregter Spezies zu beschreiben. Als Modellsubstanz diente in erster Linie das Menadion.

3. MATERIALIEN UND METHODEN

3.1. Chemikalien und Enzyme. Chemikalien und Enzyme wurden von folgenden Firmen bezogen:

Aldrich Chemical Company (Milwaukee, Wisconsin):
DABCO (1,4-Diazabicyclo-(2,2,2)octan)

Boehringer-Mannheim (Mannheim):
Glutathion,oxidiert; Glutathion,reduziert; Glutathion-Peroxidase (EC 1.11.1.9); Katalase (EC 1.11.1.6); NADH; NADPH; Superoxiddismutase (EC 1.15.1.1); Xanthin-Oxidase (EC 1.2.3.2)

Fluka (Buchs,Schweiz):
Menadion (2-Methyl-1,4-Naphthochinon), Phorone (2,6-Dimethyl-2,5-heptadien-4-on)

Merck (Darmstadt)
N-Äthylmaleinimid, 2,4-Dinitrofluorbenzol, Phenobarbital-Natrium, alle übrigen Laborchemikalien

Sigma (München)
Antimycin A, Butyliertes Hydroxyanisol (2(3)-tert-Butyl-4-hydroxyanisol), Cytochrome C (Type III), Dicoumarol, Xanthin (Natriumsalz)

Das Menadion-Glutathion-Konjugat (2-Methyl-3-glutathionyl-1,4-naphthochinon) wurde nach Nickerson et al. (1963) synthetisiert. Glutathionsulfonsäure sowie Glutathionsulfinsäure als Standard für HPLC-Untersuchungen wurden dargestellt, wie bei Calam und Waley (1962) beschrieben.

3.2. Versuchstiere und Vorbehandlung. Für die Organperfusion, die Präparation der Hepatozyten und die der Mikrosomenfraktion wurden männ-

liche Wistarratten mit einem Gewicht zwischen 180 und 260 g gewählt. Die Tiere erhielten das Standardfutter der Firma Altromin (Lage/Lippe).
Die Vorbehandlung einzelner Tiere erfolgte mit
a) Phenobarbital-Natrium; dieses wurde über einen Zeitraum von mindestens 7 Tagen in einer Konzentration von 1 mg/ml im Trinkwasser verabreicht.
b) Phoron; 1 ml einer 1,6 M Lösung in Olivenöl pro kg Körpergewicht wurde intraperitoneal zwei Stunden vor dem Töten des Tieres injiziert.

Die Versuche zur Abhängigkeit der Chemilumineszenz von der Induktion des Enzyms NAD(P)H-Chinon-Reduktase wurden an 8 Wochen alten weiblichen NMRI-Mäusen durchgeführt. Ein Teil der Tiere hatte über einen Zeitraum von 3 Wochen ein mit butyliertem Hydroxyanisol versetztes Futter erhalten; 7,5 g pro kg wurden unter das pulverförmige Futter (Altromin) gemischt (nach Benson et al, 1980).

3.3. Perfusion der Rattenleber. Die Perfusion wurde im Wesentlichen durchgeführt, wie von Sies (1978) beschrieben. Perfusionsmedium war mit CO_2/HCO_3^- gepufferte Krebs-Henseleit-Lösung. Das Medium wurde mit Carbogen (95% O_2/5% CO_2, v/v) begast und auf 37°C gehalten. Die Tiere wurden mit Nembutal betäubt, anschließend wurd i.v. Liquemin injiziert. Nach Öffnen des Peritonealraumes wurde mittels einer Polyäthylenkanüle Perfusionsmedium in die Vena Portae geleitet, die untere Vena Cava verschlossen und das Medium aus der oberen Vena Cava abgeleitet. Der Perfusionsfluß betrug zunächst etwa 10 ml/min. Nach Herausnehmen der Leber wurde diese, an der Cava-Kanüle hängend, an der Apparatur befestigt (siehe Abbildung 2). Der Perfusionsfluß wurde dann auf 3 bis 4 ml pro min und g Leber erhöht. Zusätzliche Substanzen konnten in gelöster Form während des Versuchs mittels Infusionspumpen kontinuierlich dem Perfusat zugegeben werden. Das aus der Leber ausströmende Perfusat wurde an einer O_2-Elektrode vorbeigeführt und danach zur Bestimmung weiterer Parameter in Fraktionen gesammelt.

3.4. Präparation der Hepatozyten. Hepatozyten werden aus der mit Kolla-

genase perfundierten, isolierten Leber gewonnen, wie von Sies und Großkopf (1975) beschrieben. Die Leber wurde zunächst mit einer Lösung (Medium I), die 114 mM NaCl, 25 mM $NaHCO_3$, 5,9 mM KCl, 1,2 mM MgCl, 1,2 mM $NaSO_4$, 1,24 mM NaH_2PO_4, 10 mM Glukose und 0,5 mM EGTA enthielt, in einem offenen System durchspült. Nach 15 min wurde das Perfusionsmedium ausgetauscht gegen das Medium II, welches neben den für Medium I genannten Substanzen (außer EGTA) zusätzlich 1,24 mM $CaCl_2$, 2,1 mM Pyruvat und 0,3 mM Laktat enthielt. Das Perfusionssystem, welches ein Gesamtvolumen von etwa 100 ml besaß, wurde geschlossen und ca. 60 mg Kollagenase wurden zugegeben. Während der Perfusion wurde das Medium mit 95% O_2/5% CO_2 (V/V) äquilibriert und auf 37°C gehalten. Der Fluß betrug 3-4 ml x min^{-1} x g $Leber^{-1}$. Nach 15 Minuten Perfusion wurde die Leber in einen Plastikbecher mit eiskaltem Medium II gegeben, die Zellen konnten dann mit einem Plastikspatel leicht herausgelöst werden. Die Zellsuspension wurde, nachdem die Zellen zweimal im Medium II gewaschen waren, bei 0°C aufbewahrt. Versuche mit Hepatozyten wurden innerhalb eines Zeitraums von maximal 3 Stunden nach der Präparation durchgeführt. Als Kriterium für die Qualität der Zellen wurde der Ausschluß von Trypanblau gewählt; jeweils etwa 90 - 95 % der Zellen zeigten keine Schädigung.

3.5. Präparation der Mikrosomenfraktion. Die Mikrosomenfraktionen wurden nach der von Poyer und McCay (1971) beschriebenen Methode gewonnen. Die Leber wurde in situ durch die Vena portae mit eiskalter 0,25 M Saccharose, 10 mM Triäthanolamin/HCl, pH 7,2 mit ca. 3 bis 4 ml x min^{-1} x g $Leber^{-1}$ 2 bis 3 Minuten perfundiert. Nach Entnahme der Leber, Waschen, Zerschneiden, Homogenisieren und Abzentrifugieren der schwereren Zellbestandteile wurde der sogenannte "postmitochondriale Überstand" 40 min mit 105.000 x g zentrifugiert, das Sediment in frischem Medium resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die Mikrosomenfraktionen wurden in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 bei -30°C aufbewahrt.

3.6. Präparation des postmitochondrialen Überstandes von Mäuselebern(S9). Nach dem Betäuben der Tiere mit Nembutal wurde die Leber

herausgeschnitten, in 0,25 M Saccharose, 10 mM Triäthanolamin/HCl, pH 7,2 gewaschen, und mit 4 Teilen Saccharoselösung pro 1 Teil Leber homogenisiert. Zentrifugation mit 9000 x g ergab die S9-Fraktion, wie sie für die Chemilumineszenzmessungen und die Bestimmung der NAD(P)H-Chinon-Reduktase-Akivität benutzt wurde.

3.7. Bestimmung des intrazellulären Glutathion- und $NADP^+$-Gehaltes. Reduziertes und oxidiertes Glutathion und $NADP^+$ wurden nach Frierstopp der perfundierten Leber nach den von Klingenberg (1974) für $NADP^+$ und von Akerboom und Sies (1981) für GSH und GSSG beschriebenen Methoden durchgeführt.

3.8. Messung der NAD(P)H-Chinon-Reduktase-Aktivität. Die Aktivitätsmessung wurde nach Ernster (1967) durchgeführt. Das Reaktionsgemisch enthielt den postmitochondrialen Überstand in 25 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,6, 0,2 mM NADH und 0,7 mg/ml Serumalbumin. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Elektronenakzeptors, Menadion (Endkonzentration 60 µM), gestartet und über die Extinktionsabnahme des NADH bei 340nm minus 400 nm in einem Sigma-Zweiwellenlängen-Spektralphotometer (Biochem Co., München) gemessen.

3.9. Superoxidproduzierende Modellsysteme. Die enzymatische Bildung des Superoxids wurde mit Xanthinoxidase und Xanthin oder Acetaldehyd als Substrat in sauerstoffgesättigtem 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0, bei 37°C, durchgeführt. Die Uratbildung wurde bei 313 minus 330 nm gemessen. Der Nachweis des gebildeten Superoxids wurde mit Ferricytochrom c (25 µM) durchgeführt, die Reduktion wurde bei 550 minus 540 nm gemessen (nach McCord und Fridovich, 1969).

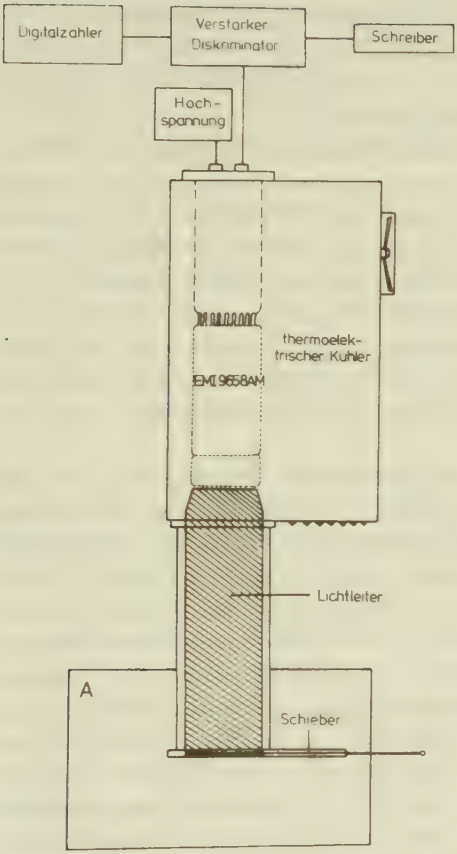
3.10. Bestimmung des Glutathiondisulfids mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie. Glutathiondisulfid (GSSG) wurde mittels HPLC nach der Methode von Reed et al. (1980) bestimmt: Nach Umsetzen der freien SH-Gruppen wurden die Aminogruppen mit Dinitrofluorbenzol derivatisiert, sodaß sie nach chromatographischer Trennung bei 365 nm zu messen waren.

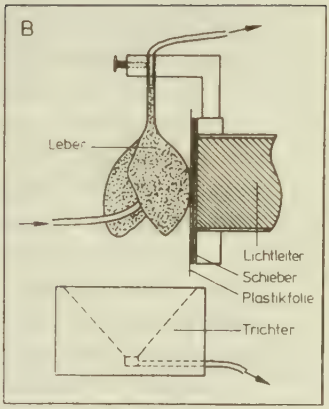
Allerdings wurde für die Reaktion mit den freien SH-Gruppen des Glutathions nicht Jodessigsäure, sondern N-Äthylmaleinimid eingesetzt, da die Reaktion mit letzterem sehr viel schneller erfolgt und damit die Möglichkeit weiterer Reaktionen der Thiolgruppen mit z.B. anderen Reaktionsprodukten verringert ist. Außerdem wurde Trichloressigsäure (1M) anstelle von Perchlorsäure eingesetzt, um oxidative Effekte bei der Proteinfällung auszuschließen. Die Trennung erfolgte mit einem Waters HPLC-System mit einer µ-Bondapak-Amin-Säule.

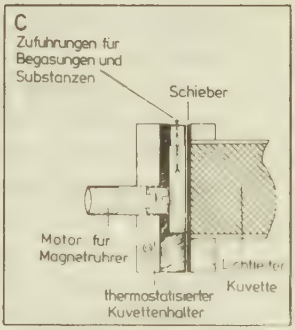
3.11. Chemilumineszenzmessung. Der zur Messung benutzte apparative Aufbau wurde von Cadenas und Sies (1983) beschrieben, lediglich die Anordnung für die Organperfusion wurde, wie in Abbildung 2 dargestellt,

---

Abbildung 2. Schematische Darstellung der Apparatur für die Chemilumineszenzmessung. Teil A zeigt die Apparatur von oben, ein Lichtleiter mit 5 cm Durchmesser stellt die optische Verbindung zwischen dem lichtemittierenden Objekt und dem Photomultiplier EMI 9658 AM her. Dessen Frontseite kann durch einen Schieber von außen gegen Licht geschützt werden. Vor diesem Lichtleiter kann entweder das perfundierte Organ (Abb. B, von der Seite betrachtet) oder der thermostatisierte Küvettenhalter angebracht werden.
Abb. B: Die in der oberen Vena Cava eingesetzte Kanüle wird mittels eines Halters befestigt. Das abfließende Perfusat wird lichtgeschützt nach außen geführt und an einer O_2-Elektrode vorbeigeleitet. Über die Vena Portae erfolgt der Zustrom des Perfusats.
Teil C: Die Küvette (3,5 x 5 cm^2 Frontfläche, 1 cm tief) befindet sich im thermostatisierten Küvettenhalter und kann mittels Magnetrührer gerührt werden. Zuführungen für Begasung und für die Zugabe von Substanzen sind lichtgeschützt nach außen geführt.


Digitalzähler
Verstärker
Diskriminator
Schreiber
Hoch-
spannung
thermoelek-
trischer Kühler
EMI 9658AM
Lichtleiter
A
Schieber


B
Leber
Lichtleiter
Schieber
Plastikfolie
Trichter


C
Zuführungen für
Begasungen und
Substanzen
Schieber
Motor für
Magnetrührer
Lichtleiter
Kuvette
thermostatisierter
Kuvettenhalter

verändert. In einem lichtdichten Metallgehäuse befindet sich das Chemilumineszenz emittierende Objekt, d.h. die in einer Küvette befindliche Suspension oder das perfundierte Organ, direkt vor einem zylinderförmigen Lichtleiter mit einem Durchmesser von 5 cm. Das ausgesandte Licht wird auf die Stirnfläche eines rotempfindlichen, thermoelektrisch auf -25°C gekühlten Photomultipliers geleitet (EMI 9658 AM), welcher mit einem Verstärker/Diskriminator, einem Digitalzähler, einem Schreiber und der Hochspannungsversorgung verbunden ist.

Messungen an Zellsuspensionen, Mikrosomenfraktionen und Modellreaktionen wurden in einer Glasküvette mit den Abmessungen 3,5 x 5 x 1,0 cm^3 durchgeführt. Die Küvette wurde auf 37°C gehalten, die Suspension wurde kontinuierlich gerührt und begast. Während der Messung konnten Substanzen durch Polyäthylenschläuche von außen zugegeben werden.

Für Messungen an der perfundierten Leber wurde der Küvettenhalter entfernt und die Leber so aufgehängt, daß sie mit einem Teil des großen Leberlappens eine durchsichtige Plastikfolie berührt, die direkt vor dem Lichtleiter angebracht war und den Lichtleiter und andere Teile vor Feuchtigkeit schützen sollte.

Zwischen Küvette bzw. dem perfundierten Organ und dem Lichtleiter können Interferenz- oder Gelatinefilter eingesetzt werden. Zur Erstellung der Spektren wurden Kodak Wratten Gelatine-Filter mit verschiedenen spektralen Durchlässigkeitsgrenzen benutzt, welche auf einem Filterrad montiert waren und von außen durch Drehen dieses Rades gewechselt wurden. Auf diese Weise war es möglich, den relativen Anteil des Lichtes in einem bestimmten spektralen Bereich zu bestimmen, wobei diese Bereiche durch die spektralen Durchlässigkeitsgrenzen der jeweiligen Filter gegeben waren. Bei lichtstärkeren Reaktionen war auch der Einsatz von Interferenzfiltern und damit die Bestimmung der Lichtintensität in sehr schmalen spektralen Bereichen möglich. Bestimmung der Chemilumineszenz bei den charakteristischen Emissionsmaxima einer lichtemittierenden Spezies und der Vergleich mit dazwischenliegenden Minima ergibt direkte Hinweise über die Beteiligung dieser Spezies an der gemessenen Chemilumineszenz. So ist eine relativ starke Chemilumineszenz bei 634 und 703 nm gegenüber derjenigen bei etwa 668 nm ein Indiz für die Beteiligung

von Singulettsauerstoff.

Bei allen Perfusionsexperimenten sowie bei Messungen mit isolierten Hepatocyten wurde zwischen Leber und Lichtleiter ein Gelatine-Filter mit der spektralen Durchlässigkeitsgrenze 620 nm plaziert, sodaß nur Licht oberhalb dieser Wellenlänge registriert wurde. Damit wurden lichtemittierende Reaktionen, wie z.B. der Übergang angeregter Carbonyle in den Grundzustand (mit Lichtemission bei 340-460 nm), von der Messung ausgeschlossen, während z.B. Singulettsauerstoff erfaßt wurde.

4. ERGEBNISSE

4.1. Charakterisierung der menadionabhängigen Chemilumineszenz in der perfundierten Rattenleber, in isolierten Hepatocyten und in Zellfraktionen

4.1.1. Menadionabhängige Chemilumineszenz und Oxidation zellulären Glutathions und NADPHs.

Wurde Menadion dem Perfusionsmedium einer isolierten Leber in einer Konzentration von mehr als 10 µM zugesetzt, so ließ sich ein Anstieg der Chemilumineszenz messen, welcher nach etwa 5 bis 8 Minuten ein Plateau erreichte. Bei 25 µM Menadion betrug dieser Anstieg etwa 1200 Counts x s^{-1}. Der Chemilumineszenzverlauf eines typischen Versuchs ist in Abb. 3 wiedergegeben. Das dem Medium zugegebene Menadion war in Dimethylsulfoxid gelöst, wobei letzteres allein keinen Effekt zeigte. Unter Standardbedingungen in Abwesenheit von Menadion zeigte die Leber keine Chemilumineszenz, die wesentlich über den apparativ bedingten Grundwert hinausging. Dieser Grundwert (zwischen 200 und 500 Counts x s^{-1} ist abhängig vom Photomultiplier, dessen Temperatur und anderen apparativen Bedingungen. Für die Dauer eines Experiments konnte er jedoch als konstant betrachtet werden.

Die menadionabhängige Lichtemission zeigt die in Abbildung 4 dargestellte spektrale Verteilung. Das abgebildete Histogramm wurde mittels nacheinander eingesetzter Wratten Gelatine-Filter ermittelt und zeigt die durchschnittliche Lichtintensität in den Wellenlängenintervallen, die durch die spektrale Durchlässigkeitsgrenzen der jeweiligen Filter gegeben sind. Die Intervallbreite liegt zwischen 10 und 40 nm. Dieses Verfahren erlaubt keine hohe spektrale Auflösung, es wurde angewandt, weil Messungen mit Interferenzfiltern, die eine bessere Auflösung erreichen, wegen der zu geringen Intensität der Chemilumineszenz nicht durchgeführt werden konnten. Trotz dieser Einschränkung kann auch aufgrund des in Abbildung 4 gezeigten Spektrums gesagt werden, daß über 90% des Lichtes im Bereich >620 nm auftritt und Lichtemission mit kürzerer

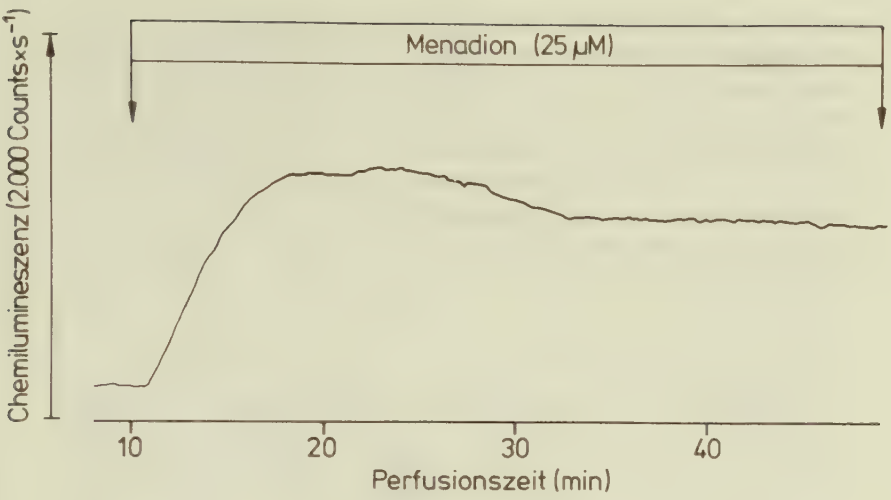


Abbildung 3. Zeitlicher Verlauf der Chemilumineszenz der isoliert perfundierten Rattenleber nach Zugabe von Menadion.
Die Perfusion erfolgte in einem offenen System, wie im Abschnitt Materialien und Methoden beschrieben. Vorgelöstes Menadion wurde im gezeigten Zeitintervall kontinuierlich mit 55 µl/min dem Perfusionsmedium zugegeben.

Wellenlänge sich auf drei Banden geringer Intensität verteilt. Damit scheiden einige Reaktionen als Quelle für die Chemilumineszenz aus, insbesondere angeregte Carbonyle sowie auch Fluoreszenz des Menadions. Dagegen ist die gezeigte spektrale Verteilung im Einklang mit der im roten Bereich liegenden Dimolemission des Singulettsauerstoffs (634 und 703 nm).

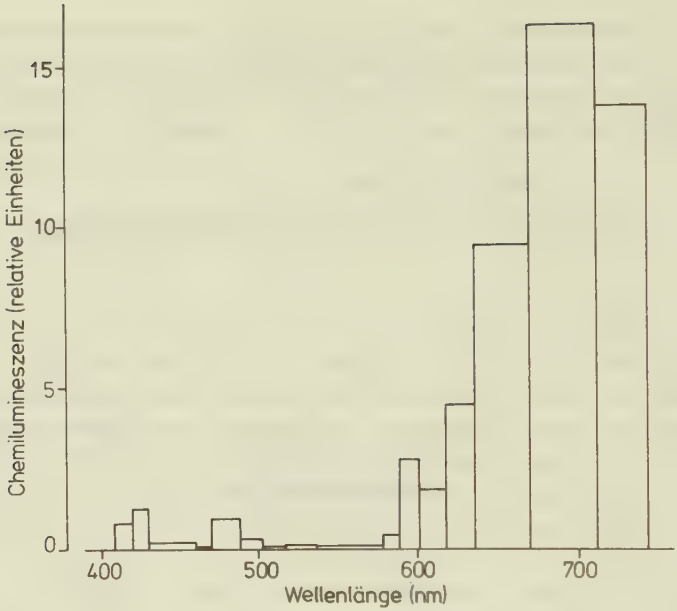


Abbildung 4. Spektrale Verteilung der menadionabhängigen Chemilumineszenz der perfundierten Rattenleber. Das Histogramm gibt die durchschnittliche Intensität der Chemilumineszenz in dem jeweiligen Wellenlängenintervall wieder. Die Intervalle sind durch die spektralen Durchlässigkeitsgrenzen der Wratten- Gelatine-Filter gegeben, die nacheinander in den Strahlengang gebracht wurden. Die Messung erfolgte an 3 verschiedenen Lebern, jeweils als Doppelbestimmung. Versuchsbedingungen wie in Abbildung 3.

Für die beschriebene Lichtemission war die Anwesenheit von Sauerstoff notwendige Bedingung. Anoxie, bewirkt durch die Begasung des Mediums mit Stickstoff anstelle von Sauerstoff, verhinderte die menadion abhängige Chemilumineszenz völlig. Nach Anoxie stieg bei erneuter Begasung mit Sauerstoff die Chemilumineszenz auf den unmittelbar vor der Anoxie gemessenen Wert (Ergebnisse nicht dargestellt).

Die Abhängigkeit der Chemilumineszenz von der Konzentration des Menadions ist in Abbildung 5A dargestellt. Offensichtlich muß eine

---

Tabelle I. Beeinflussung des zellulären Gehaltes von $NADP^+$, GSSG und GSH sowie der Chemilumineszenz und des Sauerstoffverbrauchs der perfundierten Rattenleber durch Menadion.

Zugesetzte Substanz	GSH (µmol/g Leber)	GSSG (nmol/g Leber)	$NADP^+$ (nmol/g Leber)	Chemilumineszenz (Counts/s)	O_2-Verbrauch (µmol x min^{-1} x g $Leber^{-1}$)
keine	6,6±0,4	32,8±1,8	86±14	---	2,1±0,08
Menadion (25 µM)	3,5±0,5	537 ±220	225±25	1180±233	2,7±0,11

Bedingungen: Die Perfusionen erfolgten in einem geschlossenen System wie im Abschnitt Materialien und Methoden beschrienen. Menadion, gelöst in Dimethylsulfoxid, wurde 10 min nach Beginn der Perfusion kontinuierlich mit 55 µl/min zugegeben. Frierstops der Leber wurden nach weiteren 10 min durchgeführt. Angegeben sind Mittelwerte von n≥3 Perfusionsexperimenten. Die Chemilumineszenz ist als Differenz des Plateauwertes (ca. 8 min nach Beginn der Menadionzugabe, siehe Abbildung 3) zu Kontrollbedingungen (kein Menadion) angegeben.

bestimmte Konzentration überschritten werden, um einen Anstieg der Chemilumineszenz zu bewirken. Möglicherweise hängt dies mit der Überwindung eines oder mehrerer Schutzsysteme zusammen. Diese, insbesondere die Funktion der NAD(P)H-Chinon-Reduktase, sollen später diskutiert werden. Neben dem Anstieg der Chemilumineszenz bei der Perfusion mit Menadion wurde ein deutlicher Sauerstoffmehrverbrauch der Leber (siehe Tab. 1) festgestellt. Dieser konnte über eine Verringerung der Sauerstoffkonzentration im ausfließenden Perfusat bestimmt werden.

Frierstops der Leber während der Perfusion mit Menadion zeigten ein deutliches Ansteigen des intrazellulären $NADP^+$- und GSSG-Gehaltes sowie ein Absinken des reduzierten Glutathions (Tab.1). Dies ist in Übereinstimmung mit der von Sies et al. (1983) beschriebenen Oxidation des zellulären Glutathions bei der Perfusion mit Menadion. Ein Absinken des GSH nach Zugabe von Menadion wurde auch von Thor et al. (1982) für isolierte Hepatozyten beschrieben.

An isolierten Hepatocyten konnte ebenfalls eine menadionabhängige Chemilumineszenz gemessen werden. Sie war von der Konzentration der Zellen, der Konzentration des Menadions und der Anwesenheit von Sauerstoff abhängig. Etwa 3 Minuten nach der Zugabe des Menadions wurde ein Maximum in der Lichtemission erreicht, danach sank die Chemilumineszenz wieder, sodaß sie nach weiteren 3 Minuten etwa die Hälfte des maximalen Wertes zeigte.

Die gemessene, sauerstoffabhängige Chemilumineszenz kann als Folge des Redox-Cyclings von Menadion interpretiert werden. Die Oxidation des zellulären Glutathions ist eine Folge erhöhter Superoxidentstehung, wie sie z.B. von Thor et al.(1982) an isolierten Hepatozyten in Gegenwart von Menadion mittels Ferricytochrom c-Reduktion direkt gemessen werden konnte, und der damit verbundenen vermehrten Enstehung von H_2O_2. Letzteres wird vom Glutathionperoxidase-System unter GSH-Verbrauch und Bildung von GSSG zu H_2O reduziert.

4.1.2. Verringerung der menadionabhängigen Chemilumineszenz durch Senkung des zellulären Glutathiongehaltes.

Wie bereits beschrieben, besitzt das Glutathionperoxidase-System eine Schutzfunktion bei der Eliminierung von Peroxiden einschließlich des H_2O_2, sodaß es sinnvoll schien, den Effekt einer Beeinflussung dieses Systems auf die Chemilumineszenz zu untersuchen. Die Glutathionperoxidase-Reaktion kann unterdrückt werden, indem der GSH-Gehalt drastisch verringert wird. Dies wurde durch eine Vorbehandlung der Ratten mit einem Substrat der Glutathion-S-Tranferase, Phoron, erreicht, welche den intrazellulären GSH-Gehalt auf 4 bis 10 % des ursprünglichen Wertes senkt (Younes und Siegers, 1981). In einem ebenfalls an der isoliert perfundierten Rattenleber angewandten Modellsystem, der Perfusion mit t-Butylhydroperoxid (Cadenas et al., 1982), führte diese Vorbehandlung erwartungsgemäß zu einem Anstieg der gemessenen Chemilumineszenz (Abb. 5B), erklärbar durch verminderte enzymatische Redukion des Peroxids zum Alkohol und dem Anstieg radikalischer Reaktionen, welche zur Erzeugung angeregter Moleküle führen. Demgegenüber bewirkt die Vorbehandlung mit Phoron bei der Perfusion mit Menadion ein Absinken der Chemilumineszenz auf etwa ein Drittel des Wertes, welcher mit Menadion an Kontrolltieren gefunden wurde (siehe Abb. 5A). Dieses überraschende Ergebnis weist auf eine aktive Rolle des Glutathions im Redoxzyklus des Menadions oder bei der Enstehung angeregter Moleküle hin.

4.1.3. Nachweis des Redox-Cyclings des Menadion-Glutathion-Konjugates: Messung der Chemilumineszenz und des Sauerstoffverbrauchs

Es ist bekannt, daß Menadion mit GSH unter Bildung eines Konjugates (2-Methyl-3-glutathionyl-1,4-naphthochinon) reagiert (Nickerson et al., 1963). Diese Reaktion kann nicht nur enzymatisch mittels der Glutathion-S-Transferase erfolgen, sondern geschieht auch nichtenzymatisch spontan mit einer relativ hohen Reaktionsgeschwindigkeit. Nach Smith et al.(1982) findet die Bildung des Menadion-Glutathion-Konjugates in der

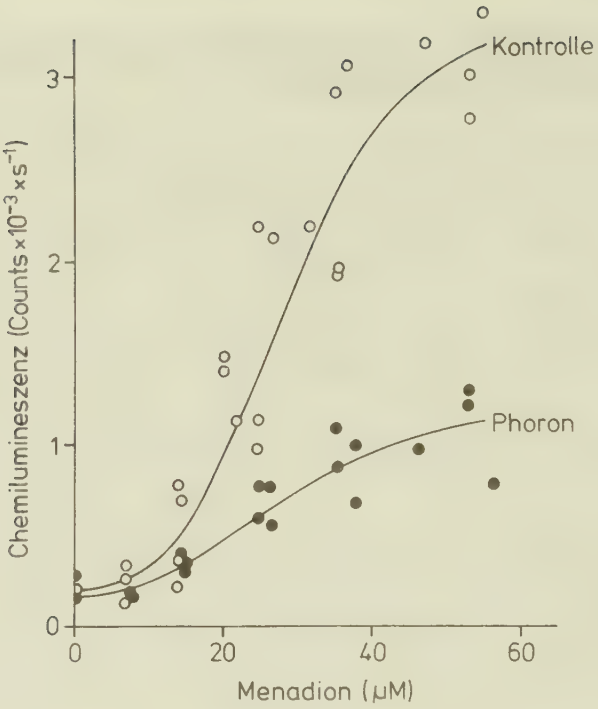


Abbildung 5A. Abhängigkeit der Chemilumineszenz der perfundierten Leber von der Menadionkonzentration. Die Punkte geben jeweils den Plateaulevel der Chemilumineszenz an, der sich einige Minuten nach Zugabe des Menadions einstellt (Abb.3). Kontrolltiere werden mit Tieren verglichen, deren GSH-Gehalt durch Vorbehandlung mit Phoron, einem Substrat der Glutathion-S-Transferase,gesenkt wurde. Bedingungen wie in Abbildung 3.

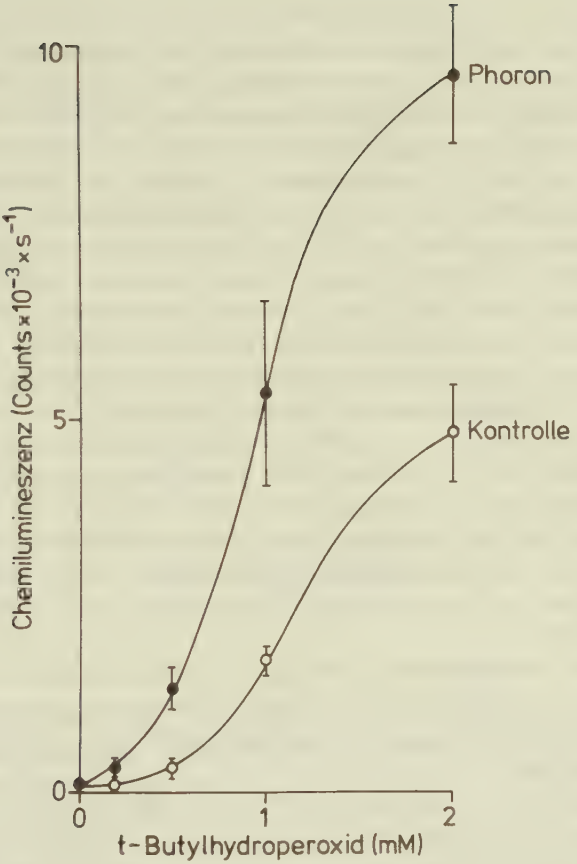


Abbildung 5B. Abhängigkeit der Chemilumineszenz der perfundierten Leber von der t-Butylhydroperoxidkonzentration bei Kontrolltieren und phoronvorbehandelten Tieren. Bedingungen wie in Abbildung 3.

Leberzelle in beträchtlichem Umfang statt: bis zu 20 % des zellulären Glutathions wurde durch die direkte Reaktion mit Menadion verbraucht. Insbesondere nach dem oben beschriebenen Effekt der Phoron-Vorbehandlung lag es nahe, das Menadion-Glutathion-Konjugat und seine Rolle bei der Entstehung der Chemilumineszenz zu untersuchen. Da Glutathionkonjugate nicht, oder nur in geringem Umfang, von außen in die Zelle gelangen können (Wahlländer und Sies, 1979), wurden Messungen mit Mikrosomenfraktionen durchgeführt. Die NADPH-abhängige Reduktion des Menadions und die anschließende Oxidation unter Bildung von Superoxid wurde von Powis und Appel (1980) beschrieben. Zunächst wurde Menadion als Substrat eingesetzt: Nach Zugabe von NADPH (0,4 mM) erfolgte ein von der Konzentration des Menadions abhängiger Sauerstoffverbrauch und parallel dazu ein relativ schnelles Ansteigen der Chemilumineszenz, wie in Abbildung 6 dargestellt. Die Höhe des Sauerstoffverbrauchs ist ebenfalls in Abb. 6 dargestellt, ihr zeitlicher Verlauf stimmt sehr gut mit dem der Chemilumineszenz überein. Nochmalige Zugabe von NADPH zeigte ein nochmaliges Ansteigen der Chemilumineszenz und des Sauerstoffverbrauchs. Dies deutet darauf hin, daß das Absinken der Chemilumineszenz und der Sauerstoffverbrauchsrate nach dem Überschreiten des Maximums durch NADPH-Verbrauch bedingt ist.

Die Chemilumineszenz wurde durch Superoxiddismutase fast völlig inhibiert , nicht jedoch durch Katalase (Tabelle II). Unter anoxischen Bedingungen war bei Zugabe von NADPH kein Anstieg der Chemilumineszenz zu beobachten.

NADH anstelle von NADPH führte nicht zu vergleichbarer Lichtemission. Die mit NADH und Menadion erzielte Chemilumineszenz war um etwa einen Faktor 5 geringer als diejenige mit NADPH und Menadion.

Kontrollinkubationen ohne Menadion, jedoch mit Mikrosomen und Sauerstoffbegasung zeigten bei Zugabe von NADPH nur einen sehr geringen Anstieg der Chemilumineszenz. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, daß die gemessenen Chemilumineszenz eine Konsequenz der Erzeugung von Superoxidradikalen durch mikrosomales Redox-Cycling ist. Die gleichen Versuche wurden nun mit dem Menadion-Glutathion-Konjugat , welches nach Nickerson et al.(1963) hergestellt wurde, durchgeführt. Wie in Abbildung

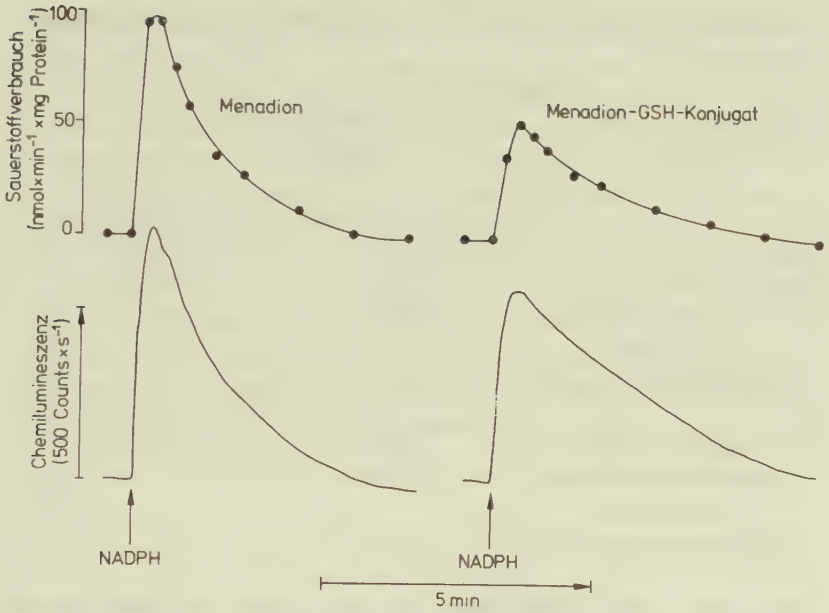


Abbildung 6. Mikrosomaler Sauerstoffverbrauch und Chemilumineszenz in Gegenwart von Menadion(50 µM) und Menadion-GSH-Konjugat (50 µM). Das Chinon wurde ca. 2 min vor Zugabe des NADPHs in die Mikrosomensuspension gegeben. Die Werte für den Sauerstoffverbrauch sind Differenzen zu Kontrollinkubationen ohne Menadion, die Chemilumineszenz wurde nicht korrigiert, Kontrollen zeigten nach Zugabe von NADPH maximal 50 Counts/s.
Mikrosomales Protein war 0,8 mg/ml in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,4, 37°C, welcher mit Sauerstoff begast wurde. Dicoumarol war in einer Konzentration von 20 µM zugesetzt.

Tabelle II. Mikrosomale Chemilumineszenz des Menadions und des Menadion-GSH-Konjugates.

Zugesetzte Substanzen	Chemilumineszenz (Counts/s)	
	O_2-gesättigt	N_2-gesättigt
Menadion (100 µM)	1800	<200
plus Superoxiddismutase (20µg/ml)	<200	---
plus Katalase (40 µg/ml)	1770	---
Menadion-GSH-Konjugat (100 µM)	1550	<200
plus Superxiddismutase (20 µg/ml)	420	---
plus Katalase (40 µg/ml)	1500	---

Bedingungen: Chemilumineszenz wurde nach Zugabe von NADPH (0,4mM Endkonzentration) gemessen. Die Küvette enthielt 1,4 mg Protein/ml. Sonstige Bedingungen wie unter Abb. 6 beschrieben.

6 und in Tabelle II gezeigt, verhält sich das Menadion-Glutathionkonjugat in Mikrosomenfraktionen bei Zugabe von NADPH wie das Menadion selbst: Bei Zugabe von NADPH erfolgte ein schnelles Ansteigen der Chemilumineszenz parallel zu einem Anstieg des Sauerstoffverbrauchs, beides allerdings in etwas geringerem Umfang als mit Menadion. Unter anoxischen Bedingungen sowie in Gegenwart von Superoxiddismutase wurde die Chemilumineszenz unterdrückt, nicht jedoch durch Katalase (Tab. II). Photometrische und HPLC-Untersuchungen zeigten keinen Hinweis dafür, daß das Konjugat während der Inkubation mit der Mikrosomenfraktion in Gegenwart von NADPH chemisch verändert wurde.

Die beschriebenen Ergebnisse zeigen, daß das Menadion-Glutathion-Konjugat ebenfalls in der Lage ist, Redox-Cycling durchzuführen und dabei Chemilumineszenz zu erzeugen. Unter Berücksichtigung des in Abbildung 5A gezeigten Effektes der Phoron-Vorbehandlung auf die menadion-induzierte Chemilumineszenz, sowie der von Smith et al. (1982) beschriebenen intrazellulären Reaktion des Menadions mit GSH erscheint eine Beteiligung des Konjugates an der Chemilumineszenz des perfundierten Organs oder der isolierten Zellen durchaus möglich zu sein. Die Bildung des GSH-Konjugates stellt für eine Reihe von toxischen, lipophilen Substanzen einen zellulären Schutzmechanismus der Leber dar, welcher diese Substanzen in eine wasserlösliche Form bringt und damit deren Exkretion in die Galle ermöglicht. Die hier beschriebenen Ergebnisse zeigen jedoch, daß im Fall des Menadions die toxische Verbindung allein durch Bildung des Glutathion-Konjugates nicht entgiftet wird.

4.1.4. Effekt der Hemmung der NAD(P)H-Chinon-Reduktase

Von Thor et al. (1982) wurden zur Klärung des Metabolismus des Menadions in Hepatocyten Untersuchungen durchgeführt, die die relative Bedeutung der Ein-Elektronen-Reduktion einerseits und die der Zwei-Elektronen-Reduktion andererseits zum Gegenstand hatten. Dazu wurden u.a. Effekte von Dicoumarol untersucht. Dicoumarol ist ein spezifischer und sehr effektiver Inhibitor der NAD(P)H-Chinon-Reduktase, welche, wie bereits erwähnt (S.5), die Zwei-Elektronen-Reduktion von einigen Chinonen durchführt. Halbmaximale Inhibition des Enzyms wurde je nach Substrat und Testbedingungen zwischen 10^{-9} und 10^{-7} M gemessen (Ernster, 1967). Thor et al. (1982) beschreiben eine Erhöhung der Menadion-Toxizität in Gegenwart von Dicoumarol: während mit 50 µM Menadion sowohl nach dem Kriterium des Trypanblau-Ausschlusses als auch bei elektronenmikroskopischer Beobachtung keine sichtbaren cytotoxischen Effekte auftraten, führte Inkubation mit Menadion und Dicoumarol (30 µM) zu einem drastischen Anstieg der Trypanblau-Aufnahme und zu elektronenmikroskopisch sichtbaren Veränderungen (Blasenbildung) der Hepatocyten; ebenfalls wurde ein erhöhter Sauerstoffverbrauch gemessen. Diese Ergebnisse wurden als Inhibition der Zwei-Elektronen-Reduktion zugunsten der Ein-Elektronen-Reduktion und damit eines erhöhtem Redox-Cyclings und einer vermehrten Superoxidentstehung interpretiert.

Im Folgenden soll nun die Bedeutung der NAD(P)H-Chinon-Reduktase auf die menadionabhängige Chemilumineszenz untersucht werden. Abbildung 7 zeigt den Effekt von Dicoumarol auf den Chemilumineszenzverlauf einer mit Menadion perfundierten Rattenleber. Ausgehend von dem bereits in Abbildung 3 gezeigten Plateau nach Zugabe von Menadion bewirkte Dicoumarol einen weiteren Anstieg bis zu einem annähernd konstanten Niveau bei etwa dem 1,5-fachen Wert. Dieser Faktor schwankte von Experiment zu Experiment relativ stark, er ist u.a. von der Konzentration des Menadions abhängig. Messungen mit isolierten Hepatocyten zeigen qualitativ das gleiche Ergebnis: die Chemilumineszenz ist in Gegenwart von Dicoumarol deutlich höher. Wie in Abbildung 8 gezeigt, trat ein dicoumarolbedingter Anstieg der Chemilumineszenz unmittelbar nach dessen Zugabe zu

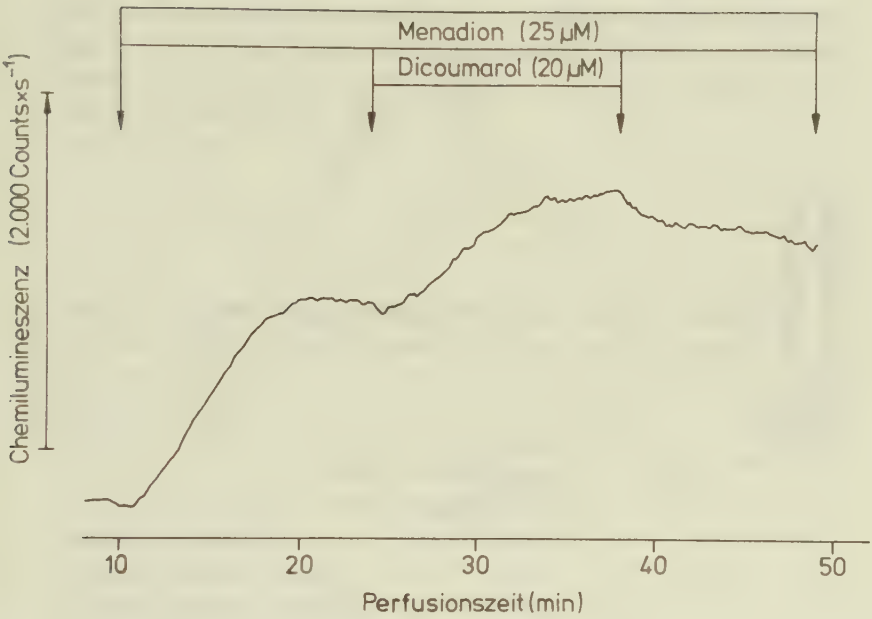


Abbildung 7. Effekt von Dicoumarol auf die menadionabhängige Chemilumineszenz der isoliert perfundierten Rattenleber. Vergl. Abb. 3.

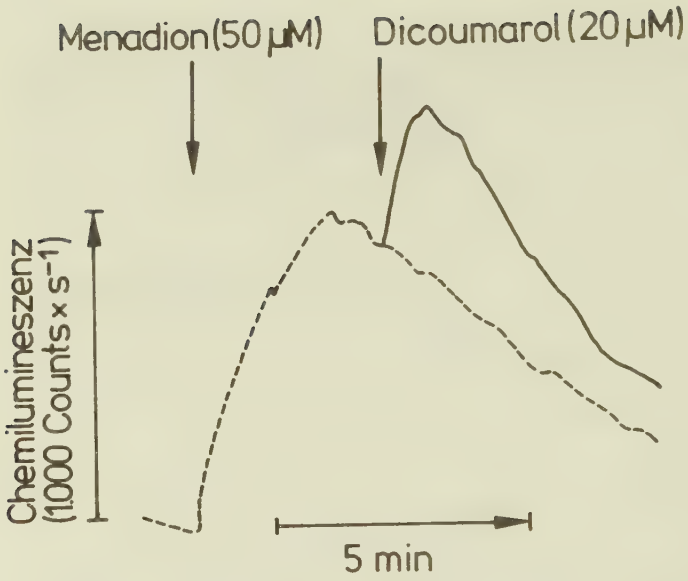


Abbildung 8. Chemilumineszenz einer Hepatocytensuspension in Gegenwart von Menadion ohne (----) und mit (——) nachfolgender Hemmung der NAD(P)H-Chinon-Reduktase durch Dicoumarol. Bedingungen: Menadion und Dicoumarol (vorgelöst in Dimethylsulfoxid) wurden zu den angegebenen Zeitpunkten zu 7 ml einer Hepatocytensuspension mit 2×10^6 Hepatocyten pro ml in Medium II (siehe Materialien und Methoden) gegeben. Die Suspension wurde auf 37^oC gehalten und mit einem Sauerstoff/CO_2-Gemisch (95/5;V/V) begast.

isolierten Hepatocyten auf. Dies war nicht der Fall, wenn die Inkubation ohne Menadion durchgeführt wurde.

Auch in Mikrosomenfraktionen führte Dicoumarol zu einer Erhöhung der Chemilumineszenz; wie in Tabelle III gezeigt, gilt dies sowohl für Menadion als auch für das Menadion-Glutathion-Konjugat. Dies deutet darauf hin, daß auch das Menadion-Glutathion-Konjugat Substrat für die NAD(P)H-Chinon-Reduktase ist.

Tabelle III. Effekt von Dicoumarol (20 µM) auf die Chemilumineszenz mikrosomaler Fraktionen mit Menadion oder Menadion-GSH-Konjugat.

Zugesetzte Substanzen	Chemilumineszenz (%)
Menadion (25 µM)	100
plus Dicoumarol (20 µM)	133±7
Menadion-GSH-Konjugat (25 µM)	62±7
plus Dicoumarol (20 µM)	88±5

Die Chemilumineszenz wurde nach Zugabe von NADPH (0,4 mM) gemessen. Die Messungen sind Mittelwerte ±S.E. von 4 Meßreihen mit Mikrosomen von Phenobarbital-vorbehandelten Ratten. Der Proteingehalt war 0,8 oder 1,6 mg/ml. Die Chemilumineszenz mit 25 µM Menadion wurde =100% gesetzt.

4.1.5. Effekt der Induktion der NAD(P)H-Chinon-Reduktase durch das Antioxidans butyliertes Hydroxyanisol (BHA).

Wie von Benson et al. (1980) beschrieben, nimmt die cytosolische Aktivität der NAD(P)H-Chinon-Reduktase in Mäuselebern nach Vorbehandlung mit butyliertem Hydroxyanisol (BHA) um etwa einen Faktor 10 zu. Nachdem oben gezeigt wurde, daß eine Hemmung der NAD(P)H-Chinon-Reduktase zu einer Erhöhung der Chemilumineszenz führt, sollte eine Induktion dieses Enzyms diese verringern. Aus diesem Grund wurden als weitere Bestätigung für die Interpretation der Rolle der NAD(P)H-Chinon-Reduktase bei der menadionabhängigen Chemilumineszenz Versuche mit Ratten durchgeführt, die mit BHA vorbehandelt waren.

Messung der NAD(P)H-Chinon-Reduktase-Aktivität in postmitochondrialen Überständen der homogenisierten Leber zeigte einen Anstieg der NAD(P)H-Chinon-Reduktase um einen Faktor 2,5. Chemilumineszenzmessungen der mit Menadion perfundierten Lebern von vorbehandelten Ratten zeigten jedoch keinen signifikanten Unterschied zu Kontrolltieren; dies lag möglicherweise daran, daß die Meßwerte auch innerhalb der zu vergleichenden Gruppen stark schwankten. Da die Enzyminduktion bei Mäusen unter den von Benson et al. (1980) beschriebenen Bedingungen offenbar in einem deutlich größeren Ausmaß im Vergleich zu Ratten zu erreichen ist, wurden nun Versuche mit Mäusen durchgeführt. Messungen der NAD(P)H-Chinon-Reduktase (Tabelle IV) nach der von Ernster (1967) beschriebenen Methode zeigten eine Induktion des Enzyms um den Faktor 13. Die absoluten Werte für die Enzymaktivität sind beträchtlich kleiner als die von Benson et al. (1980) genannten, dies liegt, wie inzwischen gezeigt werden konnte, an der Wahl eines anderen Testverfahrens: Insbesondere die Gegenwart von FAD im von Benson et al. (1980) gewählten Enzymtest bewirkt eine starke Aktivierung des Enzyms.

Chemilumineszenzmessungen an der isoliert perfundierten Leber und an isolierten Hepatocyten der Mäuse erwies sich aus experimentellen Gründen als problematisch, deshalb wurden Chemilumineszenzmessungen an postmitochondrialen Überständen (S9) der homogenisierten Mäuseleber durchgeführt. Der mit 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 verdünnten und

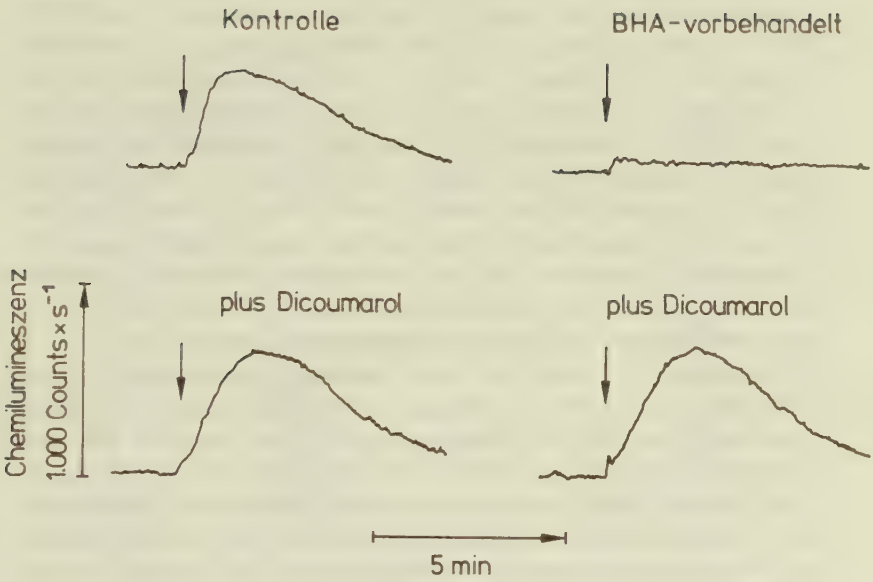


Abbildung 9. Chemilumineszenz postmitochondrialer Überstände (S9) von Mäuselebern nach Zugabe von Menadion. Links ist die Chemilumineszenz der S9-Fraktion von Kontrolltieren, rechts von BHA-vorbehandelten Tieren wiedergegeben. Menadion wurde an den durch die Pfeile angegebenen Zeitpunkten zugeführt. NADPH (0,4 mM) wurde 1 min vor Menadion zugegeben. Der Proteingehalt war 1,5 mg/ml, Dicoumarol: 30µM.

mit Sauerstoff begasten S9-Fraktion wurde zunächst NADPH (0,4 mM Endkonzentration) zugegeben, 1 Minute später Menadion. Die Zugabe von NADPH erschien sinnvoll, da damit gewährleistet war, daß in den einzelnen Inkubationen sowohl für die NADPH-Cytochrom P450-Reduktase als auch für die NAD(P)H-Chinon-Reduktase Reduktionsäquivalente zur Verfügung standen. Wie in Abbildung 9 gezeigt, führt die Zugabe von Menadion zu der S9-Fraktion von Kontrolltieren zu einem Chemilumineszenzanstieg, der nach Erreichen eines Maximums wieder absinkt. Durchführung des gleichen Versuchs in Gegenwart von Dicoumarol führt zu höherer Chemilumineszenz (Abb.9, siehe auch Tab. IV). Werden diese Messungen mit der S9-Fraktion der mit BHA vorbehandelten Tiere durchgeführt, bewirkt Menadionzugabe in Abwesenheit von Dicoumarol nur einen sehr geringen Anstieg der Chemilumineszenz, während in Gegenwart von Dicoumarol etwa der gleiche Wert erreicht wird wie in Kontrollinkubationen (Abb. 9, Tab. IV).

Abbildung 10 zeigt die sehr deutlichen Unterschiede in der Chemilumineszenz der S9-Fraktion von Mäuselebern in einem Konzentrationsbereich des Menadions zwischen etwa 50 und 250 µM; bei Inkubationen mit Dicoumarol ergeben sich demgegenüber in beiden Gruppen fast identische Werte. Offensichtlich müssen auch hier (in Abwesenheit von Dicoumarol) bestimmte Menadionkonzentrationen überschritten werden, um einen deutlichen Anstieg der Chemilumineszenz zu bewirken. Diese Grenzkonzentration ist bei vorbehandelten Tieren etwa eine Größenordnung höher (ca. 250 bis 300 µM) als bei Kontrollen (ca. 30 µM), was auch die Größenordnung der Enzyminduktion ist. Demgegenüber ist diese kritische Konzentration in beiden Gruppen in Gegenwart von Dicoumarol wesentlich niedriger. Die durch die Vorbehandlung erreichte Verschiebung dieser kritischen Konzentration ist als ein Schutz anzusehen. Das Ergebnis, daß Dicoumarol in der Lage ist, diese Schutzfunktion völlig aufzuheben (Abb. 10) und darüberhinaus in Kontrollen und vorbehandelten Tieren gleichermaßen zu noch höheren Werten führt, zeigt eindeutig, daß diese Schutzfunktion gegen die Entstehung angeregter Metabolite während des Metabolismus des Menadions von der NAD(P)H-Chinon-Reduktase wahrgenommen wird. Es schließt aus, daß andere, durch die Vorbehandlung beeinflußte Parameter, wie z.B. die auch von Benson et al. (1979) beschriebene Induktion

Tabelle IV

Effekt der BHA-Vorbehandlung auf die Menadion-induzierte Chemilumineszenz sowie auf die NAD(P)H-Chinon-Reduktase-Aktivität postmitochondrialer Fraktionen der Mäuseleber.

Vorbehandlung	Dicoumarol µM	NADH-Oxidation (nmol x min^{-1} x mg $Protein^{-1}$)	Aktivität der NAD(P)H-Chinon-Reduktase	Chemilumineszenz (Counts/s)
Standarddiät	---	10,2 ± 0,4	8,4 ± 0,7	482 ± 47
Standarddiät	30	1,8 ± 0,8		684 ± 72
BHA	---	113,8 ± 6,4	109,6 ± 5,6	68 ± 26
BHA	30	4,2 ± 0,8		597 ± 69

Die NAD(P)H-Chinon-Reduktase-Aktivität ist der Anteil der NADH-Oxidationsrate, der durch Dicoumarol hemmbar ist. Chemilumineszenz wurde nach Zugabe von Menadion unter Bedingungen wie in Abbildung 9 gemessen. Angegeben sind Mittelwerte von 3 - 4 Experimenten ± S.E..

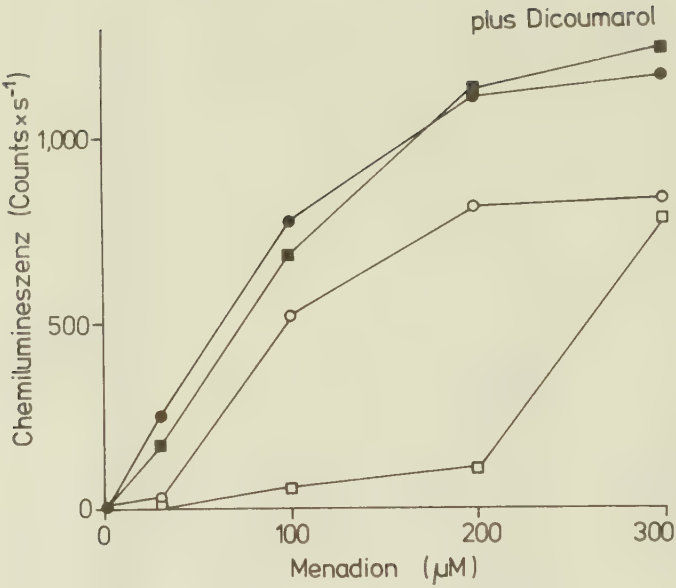


Abbildung 10. Effekt der NAD(P)H-Chinon-Reduktase-Aktivität auf das Redox-Cycling des Menadions. Menadion wurde in den angegebenen Konzentrationen zu den postmitochondrialen Fraktionen von Kontrollen (o,●) und BHA-vorbehandelten Mäusen (□,■) mit (●,■) und ohne (o,□) Dicoumarol gegeben. Sonstige Bedingungen wie in Abbildung 9.

der Glutathion-S-Transferase- oder der Epoxidhydrolase-Aktivität für die beschriebenen Effekte verantwortlich sind.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Entstehung angeregter Metabolite, möglicherweise Singulettsauerstoff, aufgrund von Menadion-Redox-Cycling entscheidend durch die NAD(P)H-Chinon-Reduktase beeinflußt werden kann. Durch Hemmung des Enzyms wurde die kritische Konzentration des Menadions, die für einen Anstieg der Chemilumineszenz erforderlich ist, zu sehr kleinen Werten verschoben, demgegenüber bewirkte die Induktion des Enzyms eine Verschiebung dieser Grenze zu Werten, die etwa eine Größenordnung höher liegen.

4.1.6. Beeinflussung der menadionabhängigen Chemilumineszenz durch Atmungskettenblocker und durch Hemmung der mitochondrialen Pyridinnukleotidtranshydrogenase.

Die im Folgenden beschriebenen Experimente (Abb. 11, 12, 13) sollen einige Aspekte des zellulären Flusses von Reduktionsäquivalenten (NADH oder NADPH) im Hinblick auf die menadionabhängige Chemilumineszenz beleuchten. Abbildung 11 zeigt den Effekt von Antimycin A, einem Inhibitor der mitochondrialen Atmungskette, auf die menadioninduzierte Chemilumineszenz der isoliert perfundierten Rattenleber. Zugabe von Antimycin A zum Perfusionsmedium zeitlich vor der Zugabe von Menadion unterdrückte den Anstieg der Chemilumineszenz fast völlig (nicht gezeigt). Abbildung 12 zeigt den Effekt von Rhein, einem Inhibitor der mitochondrialen Pyridinnukleotid-Transhydrogenase, auf die Chemilumineszenz der perfundierten Rattenleber. Dieses Enzym katalysiert die Reaktion

$$NADH + NADP^+ \longrightarrow NAD^+ + NADPH \qquad (8),$$

wobei mitochondriales NADPH mit Hilfe von Carriersystemen mit dem cytosolischen NADPH-Pool in Verbindung steht. Sowohl Antimycin A als auch Rhein zeigten bei der gewählten Menadionkonzentration in Versuchen mit isolierten Hepatocyten den gleichen Effekt auf die menadionabhängige Chemilumineszenz wie bei der perfundierten Leber. Amytal, ein Inhibitor der NADH-Dehydrogenase in der Atmungskette, zeigte ein mit Antimycin A identisches Verhalten. In Abbildung 13 ist die Wirkung von Antimycin A auf die Chemilumineszenz von Hepatocyten bei verschiedenen Menadionkonzentrationen wiedergegeben, außerdem der Effekt von gleichzeitiger Gegenwart von Dicoumarol. Die beschriebenen Ergebnisse können unter Berücksichtigung der Funktion der NAD(P)H-Chinon-Reduktase, welche in den beiden vorangegangenen Kapiteln beschrieben wurde, mit dem in Abbildung 14 dargestellten Mechanismus erklärt werden.

Die für das Aufrechterhalten des Redox-Cyclings notwendigen Reduktionsäquivalente werden über NADPH geliefert, dieses kann einerseits über den Pentose-Phosphat-Cyclus bereitgestellt werden und andererseits, vor allem bei Bedingungen erhöhten NADPH-Verbrauchs, welcher hier gegeben ist, über die Pyridinnukleotidtranshydrogenase aus mitochondrialem

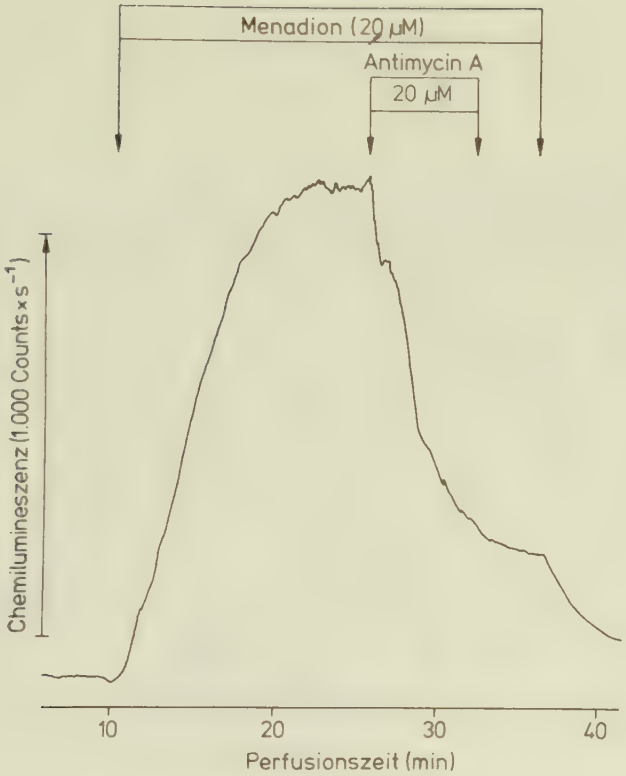


Abbildung 11. Effekt von Antimycin A auf die Chemilumineszenz der perfundierten Rattenleber. Bedingungen wie in Abbildung 3.

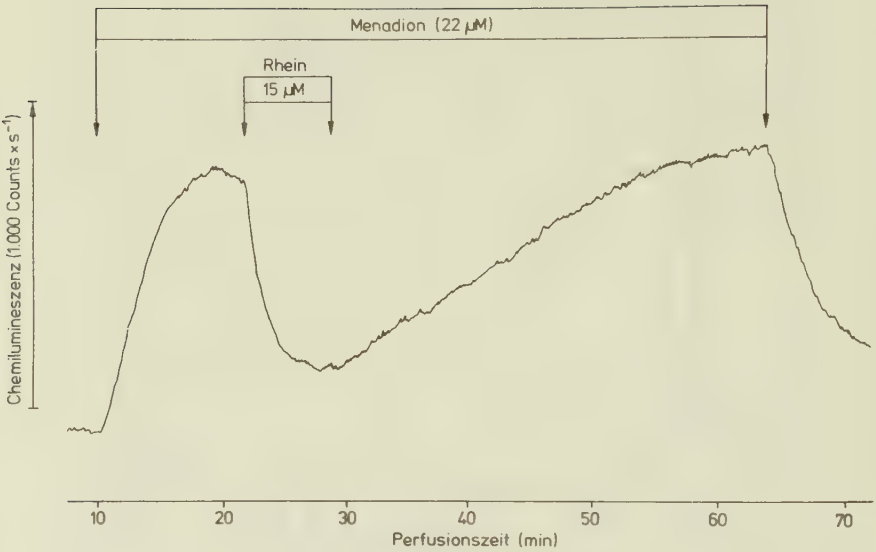


Abbildung 12. Effekt der Hemmung der mitochondrialen Pyridinnukleotid-transhydrogenase durch Rhein auf die Chemilumineszenz der perfundierten Rattenleber.
Bedingungen wie in Abbildung 3.

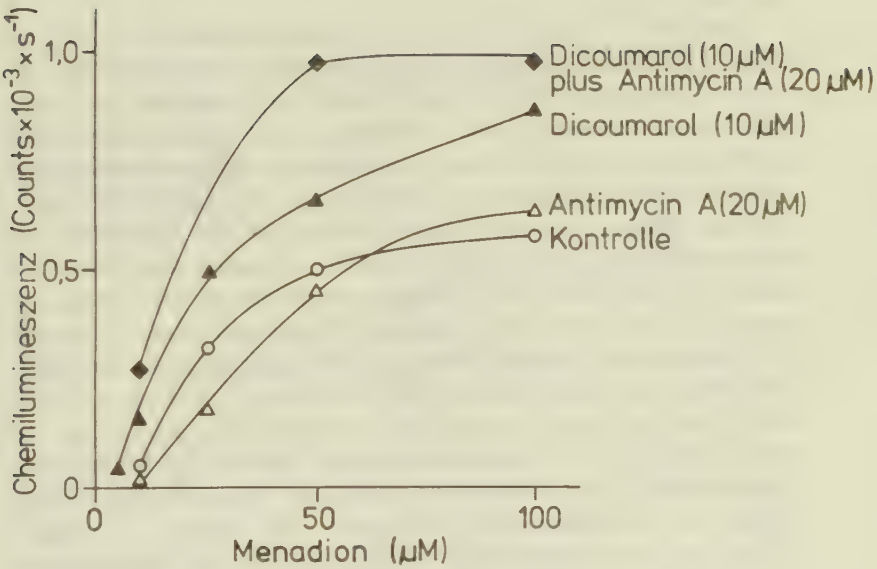


Abbildung 13. Beeinflussung der menadioninduzierten Chemilumineszenz isolierter Hepatocyten durch Dicoumarol, einem Inhibitor der NAD(P)H-Chinon-Reduktase und Antimycin A. In 7 ml Medium (Medium II, siehe Abschnitt Methoden), 37°C, mit 95% O_2/5% CO_2 (V/V) begast, befanden sich 15 x 10^6 Zellen.

NADH gebildet werden. NADH ist jedoch auch Coenzym für die NAD(P)H-Chinon-Reduktase, sodaß hier eine Konkurrenz zwschen toxischem Mechanismus (Redox-Cycling) und Schutzmechanismus (NAD(P)H-Chinon-Reduktase) vorliegt.

Abbildung 13 zeigt bei einer Menadionkonzentration von 25 µM für Hepatocyteninkubationen ohne Dicoumarol einen deutlichen Hemmeffekt von Antimycin A auf die Chemilumineszenz, während es in Gegenwart von Dicoumarol eine Steigerung bewirkt. Die Hemmung der Atmungskette verringert den Verbrauch von NADH und ermöglicht damit eine vermehrte Nutzung über andere Reaktionen. Offenbar ist es von der Aktivität der NAD(P)H-Chinon-Reduktase abhängig, ob dies eine Verstärkung oder eine Abschwächung der menadionabhängigen Chemilumineszenz bewirkt. Maximale Chemilumineszenz wurde bei gleichzeitiger Gegenwart von Antimycin und Dicoumarol gemessen, dies ist mit dem in Abbildung 14 gezeigten Schema als maximaler Fluß von Reduktionsäquivalenten über die Transhydrogenase zum NADPH, nicht jedoch zur NAD(P)H-Chinon-Reduktase erklärbar. Auch der in Abbildung 12 gezeigte Effekt von Rhein kann als Verschiebung des Flusses von Reduktionsäquivalenten interpretiert werden: Während die Verfügbarkeit von NADH erhöht wird, bedeutet die Hemmung der Transhydrogenase gleichzeitig eine Verringerung der Verfügbarkeit des NADPHs, d.h. Redox-Cycling kann nicht mehr mittels mitochondrial gebildeten NADPHs sondern nur noch mittels NADPHs aus dem Pentose-Phosphat-Cyclus vorangetrieben werden; demgegenüber steht ausreichend NADH für den von der NAD(P)H-Chinon-Reduktase katalysierten Schutzmechanismus zur Verfügung. Bei höheren Menadionkonzentrationen sind die Verhältnisse etwas anders (Abb. 13), Antimycin A zeigt in Abwesenheit von Dicoumarol keinen Hemmeffekt auf die Chemilumineszenz; möglicherweise kann die NAD(P)H-Chinon-Reduktase unter diesen Bedingungen nicht mehr hinreichend aktiviert werden.

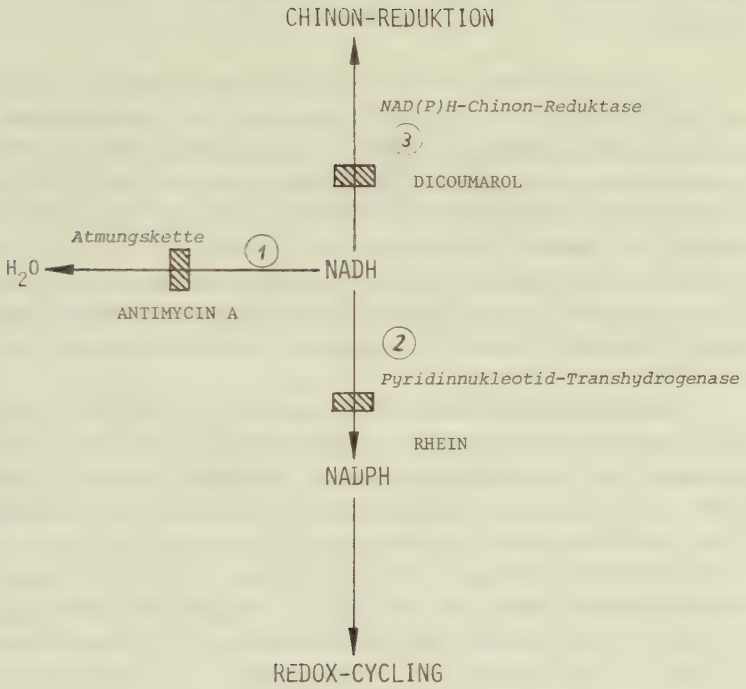


Abbildung 14. Schematische Darstellung der Effekte von Dicoumarol, Antimycin A und Rhein auf den Fluß von Reduktionsäquivalenten bei Menadion-Redox-Cycling. Das von verschiedenen Dehydrogenasen bereitgestellte NADH kann über die Atmungskette (1) oxidiert werden, über die Pyridinnukleotid-Transhydrogenase unter ATP-Verbrauch zu NADPH umgesetzt werden (2) oder mit Hife der NAD(P)H-Chinon-Reduktase die Zwei-Elektronenreduktion des Chinons ermöglichen (3). NADPH, welches für das menadionabhängige Redox-Cycling erforderlich ist, wird nicht nur über die Reaktion (2), sondern auch über den Pentose-Phosphat-Cyclus bereitgestellt.

4.1.7. Hemmung der UDP-Glucuronyltransferase und der PAPS-Sulfotransferase.

Die Schutzfunktion, welche die NAD(P)H-Chinon-Reduktase im Hinblick auf das Chinon-Redox-Cycling und die Entstehung von Chemilumineszenz besitzt, ist im Zusammenhang zu sehen mit Enzymsystemen, die das reduzierte Menadion (1,4-Dihydroxy-2-methylnaphthalin) weiter umsetzen und damit dessen biliäre Ausscheidung ermöglichen. In einer Untersuchung zum Metabolismus des Menadions in der Rattenleber wurde von Losito et al. (1967) ^{14}C-markiertes Menadion in der Galle zu einem Drittel als Ninhydrin-positive Verbindung, wahrscheinlich Menadion-Glutathion-Konjugat, außerdem als Glucuronid und Sulfat nachgewiesen, wobei das Glucuronid mit 57% den größten Anteil stellte.

Die UDP-Glucuronyltransferase, (E.C. 2.4.1.17), welche in mikrosomalen Membranen lokalisiert ist, katalysiert die Translokation der Glucuronsäure von UDP-Glucuronsäure auf ein geeignetes Substrat, welches damit zum β-Glucuronid umgesetzt wird. Dies bedeutet im allgemeinen eine drastische Veränderung der Wasserlöslichkeit der Substanzen: Substrate sind hydrophobe organische Verbindungen, die durch die Glucuronidierung hydrophil werden und damit leichter ausgeschieden werden können. Die UDP-Glucuronyltransferase ist auf bestimmte funktionelle Gruppen angewiesen, dazu gehören u.a. alkoholische, d.h. auch phenolische Gruppen (siehe auch Dutton und Burchell, 1977).

Die zweite Gruppe von Enzymen, die die Konjugation von organischen Verbindungen katalysieren, auch hier sind wieder bestimmte funktionelle Gruppen, wie z.B. Hydroxyl- oder insbesondere phenolische Gruppen erforderlich, wird durch die cytosolischen Sulfotransferasen dargestellt, welche mittels 3-Phosphoadenosin-5-phosphosulfat (PAPS) Sulfatester dieser Verbindungen erzeugen. Auch hier wird die Wasserlöslichkeit erhöht und die Auscheidung in die Galle erleichtert. Die Aryl- oder Phenol-Sulfotransferase (E.C. 2.8.2.1) ist hier im Hinblick auf das reduzierte Menadion von Interesse. Sowohl die UDP-Glucuronyltransferase als auch die Sulfotransferase können durch Salicylamid gehemmt werden (Burke et al, 1977). Da das Vorhandensein anorganischen

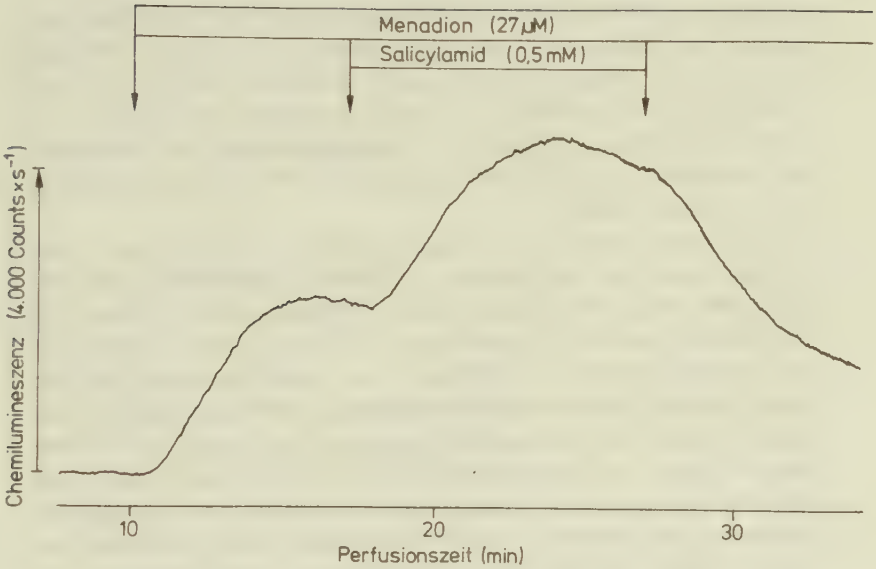


Abbildung 15. Effekt von Salicylamid auf die Chemilumineszenz der perfundierten Rattenleber.
Bedingungen wie in Abbildung 3.

Sulfats die PAPS-Synthese beeinflußt und gezeigt werden konnte, daß der Sulfatgehalt im Gewebe eines perfundierten Organs dem des Perfusats entspricht, kann darüber die Aktivität der Sulfotransferasen gesteuert werden (Krijgsheld et al, 1979).

Die im Folgenden beschriebenen Versuche sollen die Bedeutung der Glucuronidierung und Sulfatierung als Schutzmechanismus gegen Menadion-Redox-Cycling verdeutlichen. Ausgegangen wird wiederum von der Perfusion einer isolierten Rattenleber mit Menadion. Die Menadionkonzentration war so gewählt (25 µM), daß durch die Zugabe von Menadion allein bereits ein Chemilumineszenzanstieg erfolgte, die Chemilumineszenz sich jedoch deutlich unterhalb des in Abbildung 5 bei etwa 50 bis 60 µM zu erkennenden Sättigungswertes befand.

Die Abbildungen 15 und 16 zeigen die Effekte von Salicylamid (0,5 mM) und von sulfatfreier Perfusion auf die menadionabhängige Chemilumineszenz der perfundierten Leber. Sowohl die Zugabe von Salicylamid als auch Austausch des Perfusionsmediums mit 1,2 mM SO_4^{--} gegen sulfatfreies Medium zeigen eindeutig einen Anstieg der Chemilumineszenz auf ein höheres Niveau. Diese Versuche wurden jeweils dreifach durchgeführt und zeigten qualitativ das gleiche Ergebnis; es war jedoch mit dieser geringen Anzahl von Versuchen nicht möglich, statistisch abgesichert etwa den Unterschied der Chemilumineszenzerhöhung durch Salicylamid einerseits und sulfatfreier Perfusion andererseits zu ermitteln und daraus Schlüsse auf die relative Bedeutung eines dieser Mechanismen zu ziehen. In einem weiteren Versuch (nicht gezeigt) wurde eine Rattenleber mit sulfatfreiem Medium perfundiert. Nach Zugabe von Menadion und Erreichen eines Chemilumineszenzplateaus konnte dieses wiederum durch die Zugabe von Salicylamid um den Faktor 1,8 gesteigert werden. Die darauf folgende Zugabe von Dicoumarol führte dann noch zu einer weiteren, allerdings geringeren Erhöhung der Chemilumineszenz (Faktor 1,3). Die quantitative Auswertung dieser Faktoren scheint nicht sinnvoll zu sein, da ein linearer Zusammenhang zwischen Redox-Cycling und Chemilumineszenz nicht vorausgesetzt werden kann.

Es läßt sich jedoch das Ergebnis nennen, daß sowohl Sulfatierung als auch Glucuronidierung als Schutzmechanismus gegen Redox-Cycling des

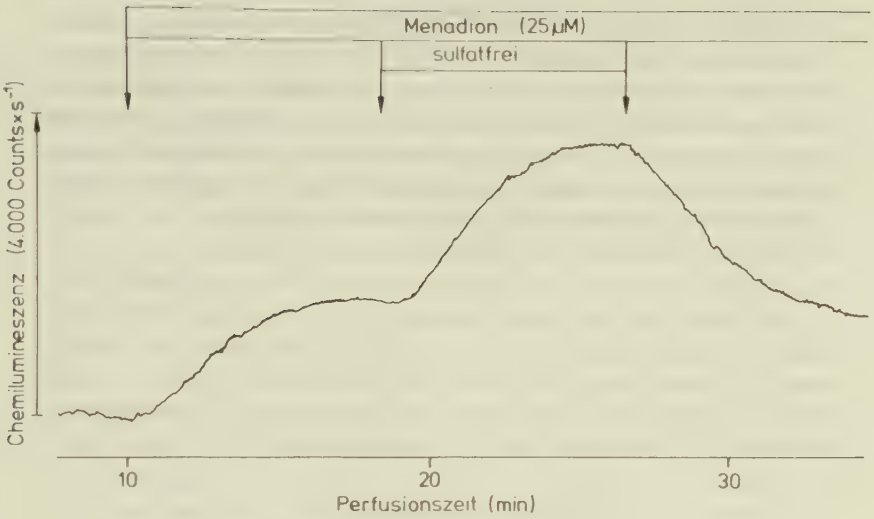


Abbildung 16. Effekt sulfatfreier Perfusion auf die Chemilumineszenz der perfundierten Rattenleber.
Bedingungen wie in Abbildung 3.

Menadions und der damit verbundenen Entstehung angeregter Moleküle eine Rolle spielen. Der in Abbildung 15 gezeigte Effekt des Salicylamids läßt sich sowohl durch die Hemmung der UDP-Glucuronyltransferase als auch durch die Hemmung der Sulfotransferase erklären. Daß jedoch die UDP-Glucuronyltransferase und die PAPS-Sulfotransferase unabhängig voneinander einen Schutzmechanismus darstellen, ist für die Sulfotransferase in Abbildung 16 gezeigt: Sulfatfreie Perfusion hemmt die Sulfatierung und führt zu höherer Chemilumineszenz. Der im Text beschriebene zusätzliche Effekt von Salicylamid auf die Chemilumineszenz der sulfatfrei perfundierten Leber weist auf die unabhängig von der PAPS-Sulfotransferase bestehende Funktion der UDP-Glucuronyltransferase hin.

4.2. Zum Mechanismus der Chemilumineszenzentstehung: Modellversuche mit Superoxid-produzierenden Systemen.

Chemilumineszenz wurde als Folge der Entstehung von Superoxid bei Redox-Cycling von Menadion beschrieben; der molekulare Mechanismus, der die Verbindung zwischen dem Superoxid $O_2^{-\cdot}$ und den lichtemittierenden Molekülen, möglicherweise Singulettsauerstoff ($^1O_2$), verbindet, ist jedoch nicht geklärt. Es läßt sich zwar sagen, daß die Interpretation der Chemilumineszenz als unmittelbare Folgeerscheinung der $O_2^{-\cdot}$-Enstehung zu einer sehr guten und weitgehenden Übereinstimmung der beschriebenen Ergebnisse mit anderen Untersuchungen von z.B. Thor et al. (1982) führt und darüberhinaus direkt die Auswirkungen von Entgiftungsmechanismen wie Glucuronidierung und Sulfatierung auf diesen Prozeß des Redox-Cyclings zeigt; die Frage nach dem Mechanismus bleibt jedoch offen. Aus diesem Grund wurden Modellversuche mit Superoxid-produzierenden Systemen durchgeführt mit dem Ziel, einen Mechanismus zu beschreiben, welcher möglicherweise der menadionabhängigen Chemilumineszenz der Rattenleber zugrundeliegt.

Zwei Modellsysteme, welche unter physiologischen Bedingungen hinsichtlich pH, Temperatur etc. einsetzbar sind, wurden hierzu ausgewählt: (1) Die vielfach beschriebene enzymatische Erzeugung von Superoxid mittels Xanthinoxidase und Xanthin bzw. Acetaldehyd als Substrat und (2) die nichtenzymatische Autoxidation eines Hydrochinons. Als Modellsubstanz lag zunächst die reduzierte Form des Menadions, (2-Methyl-1,4-dihydroxynaphthalin) nahe, die Wahl fiel jedoch auf das Menadion-Glutathion-Konjugat, welches, wie gezeigt wurde, ebenfalls in biologischen Systemen Redox-Cycling durchführen kann. Es besitzt im Vergleich zu Menadion eine höhere Wasserlöslichkeit und kann auch in Anwesenheit von Glutathion eingesetzt werden. Letzteres ist bei Menadion, wie mit einigen anderen Naphthochinonen, nicht möglich, da es spontan mit Glutathion reagiert.

4.2.1. Chemilumineszenz während der Xanthinoxidasereaktion und während der Autoxidation eines Hydrochinons.

Die Enstehung von Chemilumineszenz bei der Oxidation von Xanthin oder Acetaldehyd mit Hilfe der Xanthinoxidase ist bereits eingehend untersucht, so beschrieben bereits Stauff et al.(1963) Chemilumineszenz bei der Oxidation von Xanthin durch die Xanthinoxidase mit einer maximalen Emission bei etwa 500 nm. Arneson (1970) beschreibt für die Chemilumineszenz der Xanthin- und Acetaldehydoxidation die Abhängigkeit der Lichtemission von (a) der aktuellen H_2O_2-Konzentration sowie (b) Katalase und (c) Superoxiddismutase. Während ein relativ schneller Anstieg der Chemilumineszenz und ein hoher Maximalwert in Gegenwart von zugegebenem oder durch eine vorausgegangene Reaktion entstandenem H_2O_2 auftrat, konnte die Lichtemission durch Katalase oder Superoxiddismutase fast völlig gehemmt werden. Arneson (1970) zog aus diesen Ergebnissen den Schluß, daß es nicht die Dismutation von Superoxid zu H_2O_2 (siehe Reaktion(1), Seite 6) ist, die für die Entstehung der Chemilumineszenz verantwortlich ist, sondern daß über die Reaktion von $O_2^{-\cdot}$ mit H_2O_2 (Reaktion 4, S.8) $OH^{\cdot}$-Radikale entstehen und daß Singulettsauerstoff aus einer weiteren Reaktion von $O_2^{-\cdot}$ mit $OH^{\cdot}$-Radikalen gebildet wird:

$$O_2^{-\cdot} + OH^{\cdot} \longrightarrow OH^- + {}^1O_2 \qquad (9)$$

Es wurden Chemilumineszenzmessungen mit Xanthinoxidase und Xanthin oder Acetaldehyd als Substrat durchgeführt, welche die oben beschriebenen Ergebnisse bestätigten und hier nicht weiter dargestellt werden sollen.

Als zweites Modellsystem wurde die Autoxidation des reduzierten Menadion-Glutathion-Konjugates (1,4-Dihydroxy-2-methyl-3-glutathionyl-naphthalin) untersucht. Das Konjugat wurde in einer konzentrierten Lösung (15 mM) mittels Wasserstoffbegasung über Palladium reduziert und in den mit Sauerstoff begasten Puffer pH 7.0 gegeben (Endkonzentration 100 µM). Die Autoxidation konnte über den sofort einsetzenden Sauerstoffverbrauch verfolgt werden, Chemilumineszenz konnte jedoch nicht gemessen werden. Allerdings bewirkte die Zugabe von Fe^{3+} und EDTA (1:1)

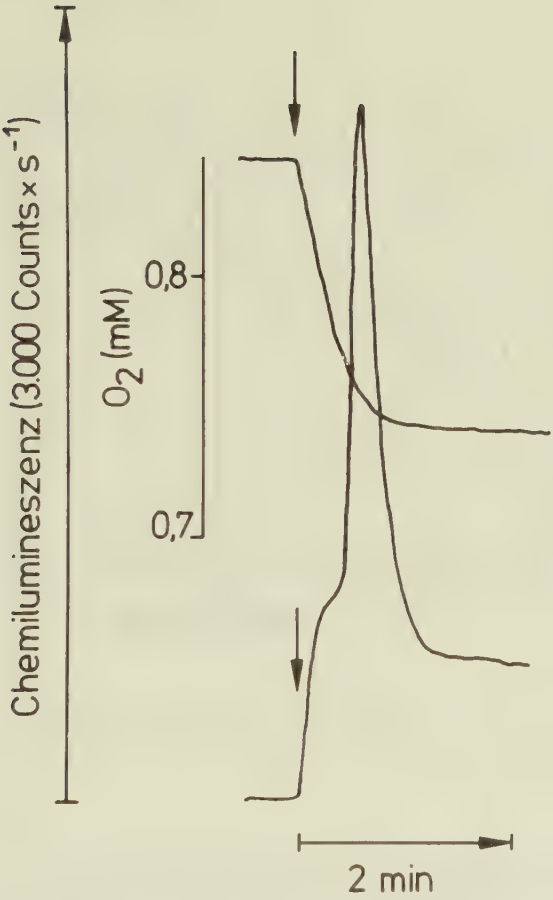


Abbildung 17. Chemilumineszenz und Sauerstoffverbrauch bei der Hydrochinonautoxidation in Gegenwart von FeIII-EDTA. Die obere Kurve zeigt den Verlauf der O_2-Konzentration im Medium (0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4, vor dem Versuch mit 100% O_2 begast), die untere Kurve den zeitlichen Verlauf der Chemilumineszenz. Das reduzierte Chinon (100 µM) wird an dem durch die Pfeile angegebenen Zeitpunkt zugegeben.

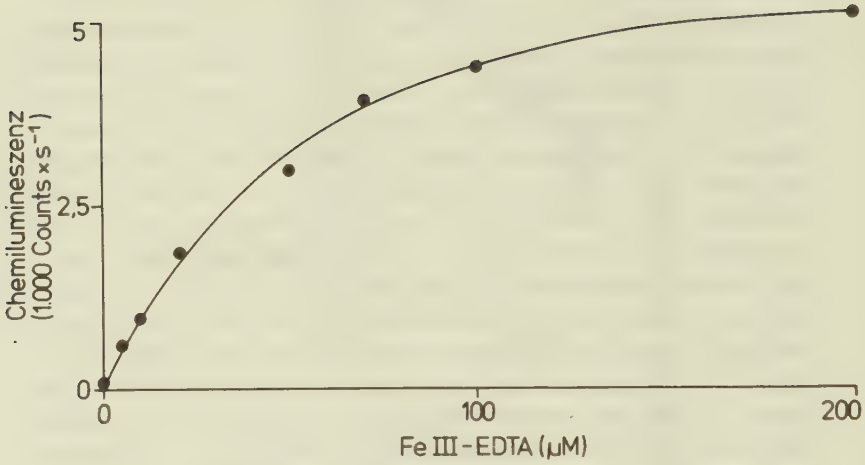


Abbildung 18. Abhängigkeit der Chemilumineszenz während der Hydrochinonautoxidation von der FeIII-EDTA-Konzentration. Bedingungen wie unter Abbildung 17 beschrieben.

eine Lichtemission (siehe Tab. V), wobei sich der Sauerstoffverbrauch nicht oder nur geringfügig änderte: ohne Fe^{3+}EDTA wurde bei Oxidation von 100 µM des Chinols ein Sauerstoffverbrauch von 100,2 ±2 µM gegenüber 95,6 ±3 µM ($\bar{x}$±SEM) in Gegenwart von Fe^{3+}EDTA gemessen.

Der zeitliche Verlauf der Chemilumineszenz sowie der Verlauf der Sauerstoffkonzentration im Medium nach Zugabe des reduzierten Menadion-Glutathion-Konjugates, FeEDTA 50 µM, ist in Abbildung 17 wiedergegeben. Abbildung 18 zeigt die Abhängigkeit der Chemilumineszenz von der Fe^{3+}EDTA-Konzentration. Tabelle V zeigt die Effekte von Katalase, Superoxiddismutase und Mannitol, einem $OH^{\cdot}$-Quencher. Aus den gezeigten deutlichen Hemmeffekten kann der Schluß gezogen werden, daß sowohl H_2O_2, $O_2^{-\cdot}$ und $OH^{\cdot}$ an der Entstehung der Chemilumineszenz beteiligt sind.

Spektrale Auflösung der Lichtemission mit Hilfe von Kodak Wratten Gelatine-Filtern ergibt das in Abbildung 19 wiedergegebene Spektrum. Die maximale Lichtemission liegt im Breich zwischen 488 und 502 nm, weitere relative Maxima sind in den Intervallen 536-552, 576-590 und, schwach

---

Tabelle V. Chemilumineszenz bei der Autoxidation von Menadion-Glutathion-Konjugat. Effekte von Fe^{3+}EDTA, Katalase, Superoxiddismutase und Mannitol.

Bedingungen wie in Abbildung 17, Fe^{3+}EDTA jeweils 50 µM.

Substanzen	Chemilumineszenz (Counts x s^{-1})
Menadion-Glutathion-Konjugat (100 µM)	<100
- plus FeEDTA	2950
- plus FeEDTA und Katalase (15 µg/ml)	<100
- plus FeEDTA und Superoxiddismutase (15 µg/ml)	840
- plus FeEDTA und Mannitol (10 mM)	<100

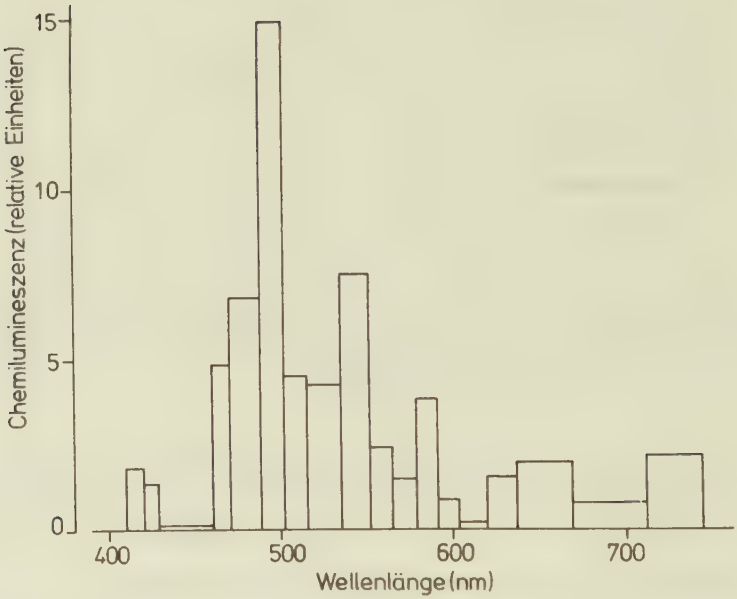


Abbildung 19. Spektrum der Chemilumineszenz bei der Oxidation reduzierten Menadion-GSH-Konjugates in Gegenwart von FeIII-EDTA (50 µM). Das reduzierte Menadion-GSH-Konjugat (100 µM) wurde in sauerstoffgesättigten Phosphatpuffer pH 7,0 gegeben.

ausgeprägt, zwischen 635 und 670 sowie zwischen 710 und 742nm.

Zusammenfassend läßt sich sagen: Die Chemilumineszenz bei der Xanthinoxidase-Reaktion sowie bei Autoxidation eines Hydrochinons in Gegenwart von FeEDTA, hier gezeigt am Beispiel des reduzierten Menadion-Glutathion-Konjugates, kann durch Superoxiddismutase, Katalase und durch Hydroxylradikalquencher gehemmt werden. Das heißt, sowohl H_2O_2, $O_2^{-\cdot}$ und $OH^{\cdot}$ sind für die Lichtemission notwendig. Dies, und auch die Bedeutung des komplexierten Eisens bei der Chemilumineszenz der Hydrochinonautoxidation spricht für einen durch FeEDTA katalysierten Mechanismus, wie er auf S.8 beschrieben ist. Möglicherweise ist komplexiertes Eisen auch in den Enzympräparationen enthalten, die für die Untersuchungen des Xanthinoxidase/Acetaldehyd-Systems benutzt wurden und spielt auch hier eine Rolle bei der Entstehung der Chemilumineszenz.

Die oben beschriebenen Ergebnisse zeigen, daß unter den beschriebenen Bedingungen Chemilumineszenz durch das Superoxidanion selbst, z.B. bei der Dismutation, nicht meßbar auftritt. Darüberhinaus zeigen die hier gemessene spektrale Verteilung der Chemilumineszenz bei der Hydrochinonautoxidation sowie die für das Xanthinoxidase/Acetaldehyd-System beschriebenen Untersuchungen der spektralen Verteilung der Chemilumineszenz (Cadenas und Chance, 1981), daß die Lichtemission zum weitaus größten Teil nicht im roten Bereich des Spektrums stattfindet. Das heißt, daß allenfalls ein relativ geringer Teil durch den bimolekularen Übergang des $^1O_2$ mit Lichtemission bei 634 und 703 nm hervorgerufen wird.

Die hier beschriebenen Ergebnisse lassen es somit unwahrscheinlich erscheinen, daß die am perfundierten Organ oder an isolierten Hepatocyten gemessene Chemilumineszenz die oben beschriebenen Reaktionen zur Ursache hat, da die Organ- und Zellchemilumineszenz fast ausschließlich im Bereich oberhalb von 620 nm liegt (siehe Spektrum der Organchemilumineszenz, Abb. 4).

Auch die gleichzeitige Notwendigkeit von H_2O_2, $O_2^{-\cdot}$, und $OH^{\cdot}$ für das Auftreten der in diesem Kapitel beschriebenen Chemilumineszenz läßt es zumindest sehr unwahrscheinlich erscheinen, daß der mit den Reaktionen 6,8 und 9 beschriebene Mechanismus innerhalb der Zelle als Ursache

für die gemessene Chemilumineszenz des Organs und der Hepatocyten in Frage kommt. Dies gilt insbesondere im Hinblick auf die Vielzahl der in der Zelle vorhandenen Schutzmechanismen. Vielmehr sind andere Reaktionen des beim Redox-Cycling entstehenden Superoxids mit zellulären Bestandteilen wahrscheinlicher. Es wurde daher der Versuch unternommen, bei der direkten Reaktion des Superoxids mit zelleigenen Substanzen Chemilumineszenz nachzuweisen.

4.2.2. Superoxid-produzierende Modellsysteme in Gegenwart von GSH.

Die Untersuchung der Reaktion des Superoxids mit reduziertem Glutathion lag aus verschiedenen Gründen nahe: Bielski und Shiue (1979) zeigten, daß $HO_2^{\cdot}$ mit Cystein, einer der drei Aminosäuren des Glutathions mit $k \leq 601\ M^{-1} \times s^{-1}$ reagiert, nicht jedoch mit der Mehrzahl der anderen Aminosäuren. Es liegt die Vermutung nahe, daß das Superoxid mit der Thiolgruppe des Cysteins reagiert. McNeil et al. (1981) beschreiben Effekte des Glutathions auf Testverfahren für Superoxid, Adrenochrombildung aus Adrenalin sowie Dianisidinoxidation, und diskutieren die Möglichkeit, daß GSH direkt mit dem Superoxid reagiert. Die Reaktion des reduzierten Glutathions mit - vor allem strahleninduzierten - Radikalen ist vielfach beschrieben worden (siehe z.B. Kosower und Kosower, 1978). Der Reaktionsmechanismus ist in den Reaktionen (10) und (11) wiedergegeben:

$$GSH + R^{\cdot} \longrightarrow GS^{\cdot} + RH \qquad (10)$$

$$GS^{\cdot} + GS^{\cdot} \longrightarrow GSSG \qquad (11).$$

Ersetzt man $R^{\cdot}$ in Reaktionsgleichung (10) durch die protonierte Form des Superoxids, so erhält man

$$GSH + HO_2^{\cdot} \longrightarrow GS^{\cdot} + H_2O_2 \qquad (12).$$

Bei der Untersuchung der Reaktion von Superoxid mit GSH sind darüberhinaus andere Folgereaktionen in Betracht zu ziehen, so ist mit Hilfe von Pulsradiolyse-Experimenten gezeigt worden, daß Thiylradikale mit Sauerstoff reagieren (Reaktion 13 für das Beispiel Glutathion). Die ermittelten Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten für die Reaktion mit Cystein sind $8{,}1 \times 10^9\ M^{-1} \times s^{-1}$ (Schäfer et al., 1978, in Übereinstimmung mit Barton und Packer, 1970) und $1{,}6 \times 10^9\ M^{-1} \times s^{-1}$ für Glutathion (Quintiliani et al., 1977).

$$GS^{\cdot} + O_2 \longrightarrow GSOO^{\cdot} \qquad (13)$$

Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten für die Rekombination von Thiylradikalen liegen im Bereich von $k = 3 \times 10^9$ bis $1{,}4 \times 10^{10}\ M^{-1} \times s^{-1}$; für Glutathion (Reaktion (11)) wurde bei pH 3,9 der Wert $k = 3{,}4 \times 10^9 \times M^{-1} \times s^{-1}$ genannt (Hoffman und Hayon, 1972). Dieser Wert ist in der gleichen Größenordnung wie die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante

der Sauerstoffadditionsreaktion, d.h. daß in Gegenwart von Sauerstoff neben Reaktion (11) auch Reaktion (13) von Bedeutung ist. Aufgrund der im Vergleich zur Konzentration der $GS^{\cdot}$-Radikale hohen Konzentration des Sauerstoffs im Medium ist sogar ein Überwiegen der Sauerstoffadditionsreaktion zu erwarten.

Im Folgenden soll nun die direkte Reaktion des Superoxids mit reduziertem Glutathion in wässrigen Systemen sowie die Bildung des Disulfids als Produkt dieser Reaktion beschrieben werden. Außerdem wird die Messung angeregter Moleküle wie $^1O_2$ über ihre Lichtemission beschrieben.

4.2.3. Nachweis der Reaktion des Superoxids mit reduziertem Glutathion.

Eine häufig angewandte Methode zum quantitativen Nachweis von Superoxid ist die photometrische Messung der Ferricytochrom c-Reduktion durch $O_2^{-\cdot}$, wie sie z.B. von McCord und Fridovich (1969) beschrieben wurde. Um ausschließlich die durch das Superoxid bedingte Cytochrom c^{3+}-Reduktion zu erfassen, wird jeweils die Differenz zu Kontrollen in Gegenwart von Superoxiddismutase betrachtet. Abbildung 20 zeigt die Ferricytochrom c-Reduktion durch Superoxid, welches mittels des Xanthinoxidase/Acetaldehyd-Systems erzeugt wurde, bei verschiedenen GSH-Konzentrationen. In Gegenwart von GSH war die Ferricytochrom c-Reduktion verringert, wobei der halbmaximale Effekt bei etwa 2,2 mM GSH auftrat. Der 100%-Wert entspricht einer Superoxid-abhängigen Cytochrom c-Reduktionsrate von 1,6 µM x min^{-1}. Die nicht durch Superoxid bedingte Reduktionsrate war von der GSH-Konzentration abhängig, bei pH 7,0 und 5 mM GSH betrug sie 1,2 µM x min^{-1}. Bei pH 5,0 war der entsprechende Wert vernachlässigbar gering (0,05 µM x min^{-1}). Die nicht durch Superoxid bedingte Ferricytochrom c-Reduktion wird durch direkte Reduktion mittels GS^- erklärt, welches mit GSH in einem pH-abhängigen Gleichgewicht ist. Die in Abbildung 20 gezeigte Beeinflussung der superoxidabhängigen Ferricytochrom c-Reduktion durch GSH kann als direkter Nachweis der

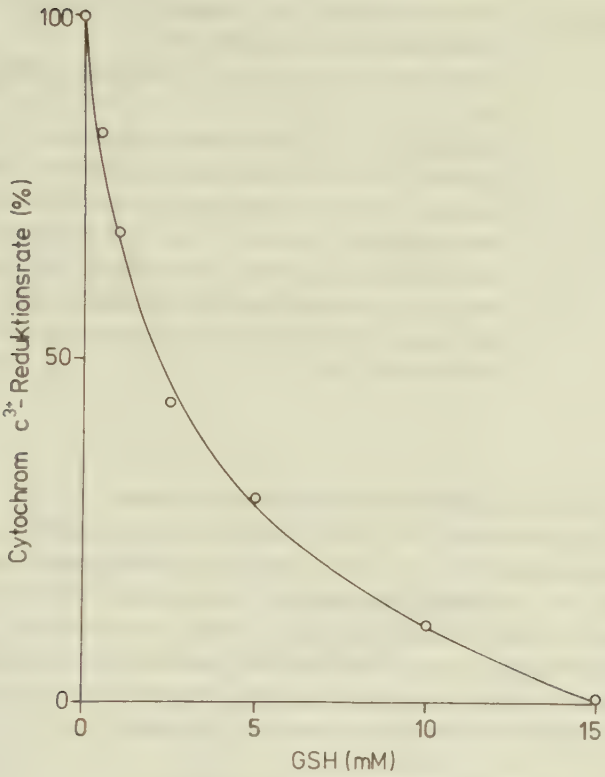


Abbildung 20. Hemmung der Superoxid-abhängigen Cytochrom c-Reduktion durch GSH. Die Punkte geben die Differenz der Ferricytochrom c-Reduktionsrate bei verschiedenen GSH-Konzentrationen nach Zugabe von Xanthinoxidase (0,6 mU/ml) wieder, abzüglich des Wertes, der in Kontrollen, d.h. in Gegenwart von Superoxiddismutase (40 µg/ml) gemessen wird. 100% entspricht einem Wert von 1,6 µM/min. Die Xanthinkonzentration war 50 µM.

Abbildung 21. Zeitlicher Verlauf der Entstehung von GSSG bei Inkubation im Xanthinoxidase/Xanthin-System.
A: Bildung von GSSG ohne (o) und mit(•) Superoxiddismutase.
Bedingungen: 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0, mit 100 % O_2 begast, enthielt 5 mM GSH, 0,7 mM Xanthin und 40 µg/ml Katalase. Die $O_2^{-}\cdot$-Entstehung wurde durch Zugabe von Xanthinoxidase gestartet. Die Reaktion wurde gestoppt, indem Aliquots der Probe in eiskalte Trichloressigsäure (1M) mit 50 mM N-Äthylmaleimid gegeben wurden.
Die Werte in A und C sind Mittelwerte von jeweils drei Experimenten ±S.E..

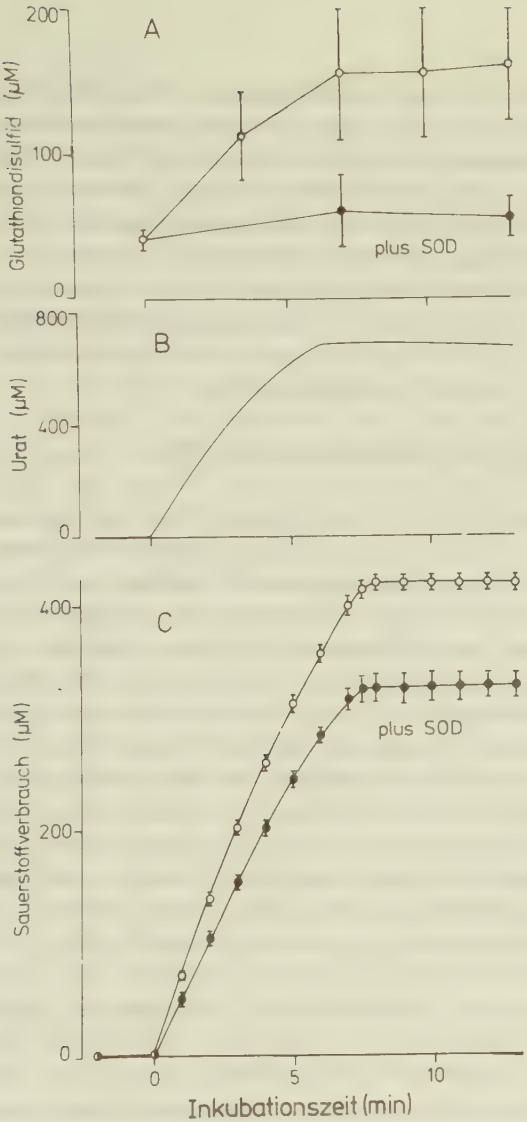
Reaktion des Superoxids mit GSH betrachtet werden.

Von Bedeutung ist hier insbesondere das Ergebnis, daß GSH-Konzentrationen von 5 - 10 mM, wie sie in Zellen gemessen wurden (Wahlländer et al, 1979a) ausreichen, um den größten Teil des gebildeten Superoxids wegzufangen. Das heißt, daß - vor allem unter Bedingungen erhöhter oxidativer Belastung oder Verringerung der Superoxiddismutase-aktivität - die Rolle des Glutathions beim Auftreten reaktiver Sauerstoffmetabolite durchaus von Bedeutung sein kann.

4.2.4. Superoxid-abhängige Oxidation des GSH

Proben aus Inkubationen einer GSH-Lösung (5 mM) mit einem Superoxid-produzierenden System (Xanthinoxidase/Xanthin) wurden mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) nach der von Reed et al. (1980) beschriebenen Methode auf die Bildung oxidierten Glutathions untersucht. Um eine Oxidation des GSH durch das ebenfalls bei der Xanthinoxidasereaktion entstehende H_2O_2 auszuschließen, wurden diese Inkubationen in Gegenwart von Katalase (40 µg/ml) durchgeführt.

Abbildung 21 A zeigt den zeitlichen Verlauf der GSSG-Entstehung.


A
Glutathiondisulfid (µM)
200
100
0
plus SOD
B
Urat (µM)
800
400
0
C
Sauerstoffverbrauch (µM)
400
200
0
plus SOD
0
5
10
Inkubationszeit (min)

Ausgehend von einer bereits im Inkubationsmedium befindlichen Konzentration (ca 40 µM) zeigte sich ein Anstieg des gebildeten Disulfids auf etwa 120 µM. In Gegenwart von Superoxiddismutase war diese GSSG-Bildung nicht bzw. nur in sehr geringem Umfang zu sehen. Abbildung 21 B zeigt den zeitlichen Verlauf der Uratentstehung, welche photometrisch bei 313 minus 330 nm als Meßgröße für die Xanthinoxidation und damit die $O_2^{-\cdot}$-Entstehung verfolgt wurde. Es ist offensichtlich, daß der zeitliche Verlauf der Xanthinoxidation und der GSSG-Entstehung übereinstimmen. Die Uratbildung, d.h. die Oxidation des Xanthins, wurde weder durch GSH, Superoxiddismutase noch durch Katalase beeinflußt.

4.2.5. Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs durch GSH.

In Gegenwart von GSH war der Sauerstoffverbrauch während der Xanthinoxidation deutlich erhöht. Dies zeigte sich auch in Gegenwart von Katalase, wo der Gesamt-Sauerstoffverbrauch aufgrund der O_2-Bildung durch die Katalasereaktion (Reaktion (2)) natürlich geringer war. Abbildung 21 C zeigt den Sauerstoffverbrauch in Gegenwart von Katalase und 5 mM GSH bei Oxidation von 700 µM Xanthin. Superoxiddismutase verringert den Sauerstoffverbrauch von 419 µM auf 329 µM, wobei der letzte Wert sehr nahe am Sauerstoffverbrauchswert ohne GSH (322 µM) liegt. Abbildung 22 zeigt den Effekt unterschiedlicher GSH-Konzentrationen auf den Sauerstoffverbrauch bei der Oxidation von 400 µM Xanthin sowie dessen vollständige Unterdrückung in Gegenwart von Superoxiddismutase. Die beschriebenen Ergebnisse zeigen, daß GSH-Zugabe aufgrund der Reaktion des GSH mit Superoxid bei unverändertem zeitlichen Verlauf der Xanthinoxidation einen Mehrverbrauch an Sauerstoff zur Folge hat.

4.2.6. Superoxidabhängige Chemilumineszenz in Gegenwart von GSH.

Abbildung 23 zeigt den Verlauf der Chemilumineszenz der Xanthinoxidasereaktion (Xanthinoxidase 30 mU/ml) für Xanthin (500 µM) oder Acetaldehyd (5 mM) als Substrat unter verschiedenen Bedingungen. Der Einsatz von Xanthin als Substrat war insofern begrenzt, als die Chemilu-

mineszenz bei höheren Xanthinkonzentrationen (>500 µM) wieder abnahm, was durch Interaktion des Xanthins mit $^1O_2$ erklärt werden kann.

Die mit (b) bezeichneten Kurven geben die Chemilumineszenz im gesamten sichtbaren Spektrum wieder, wobei sich kein GSH in der Küvette befindet. Im Bereich $\lambda > 620$ nm, d.h. im roten Bereich des Spektrums, tritt, in Übereinstimmung mit den unter 4.2.1. genannten Ergebnissen, bei Acetaldehyd als Substrat nur sehr geringe, bei Xanthin als Substrat keine meßbare Chemilumineszenz auf (Kurven a). Dies zeigt zumindest für den Fall des Acetaldehyds , daß die Lichtemission zum weitaus größten Teil nicht im roten Bereich des Spektrums erfolgt.

Die Kurven 23 (d) beschreiben den Verlauf der Chemilumineszenz in Gegenwart von 5 mM GSH im gesamten Spektrum, die Kurven (c) im Bereich >620 nm. GSH bewirkt eine deutlich höhere Chemilumineszenz mit einem deutlich anderen zeitlichen Verlauf, die darüberhinaus im Gegensatz zu derjenigen in Abwesenheit von GSH zum überwiegenden Teil (mehr als 80%) im roten Bereich liegt. Dieser unterschiedliche zeitliche Verlauf, der z.B. bei dem Vergleich der Kurven (b) und (d) der Abbildung 23 deutlich wird, weist bereits auf die unterschiedlichen Mechanismen bei der Entstehung der Chemilumineszenz hin: Das langsame Ansteigen bei (b) ist durch die notwendige Akkumulation von H_2O_2, welches in diesem Fall für die Chemilumineszenzentstehung erforderlich ist, zu erklären, während im Fall (d) sofort nach Start der Reaktion der höchste Wert der Lichtemission erreicht wird, d.h. eine Akkumulation eines Produktes der ablaufenden Reaktionen ist nicht erforderlich.

Abbildung 24 zeigt die Chemilumineszenz in Abhängigkeit von der GSH-Konzentration. Bei dem Vergleich der Lichtemission im roten Bereich des Spektrums ($\lambda > 620$ nm) mit der Chemilumineszenz mit Wellenlängen unterhalb von 620 nm zeigte sich: Die rote Lichtemission besaß einen minimalen Wert bei Inkubationen ohne GSH und stieg in Abhängigkeit von der GSH-Konzentration sehr stark an. Chemilumineszenz im nicht-roten Bereich zeigte in Abwesenheit von GSH den maximalen Wert, geringe Konzentrationen des GSH (0,25 mM) führten bereits zu einer deutlichen Hemmung.

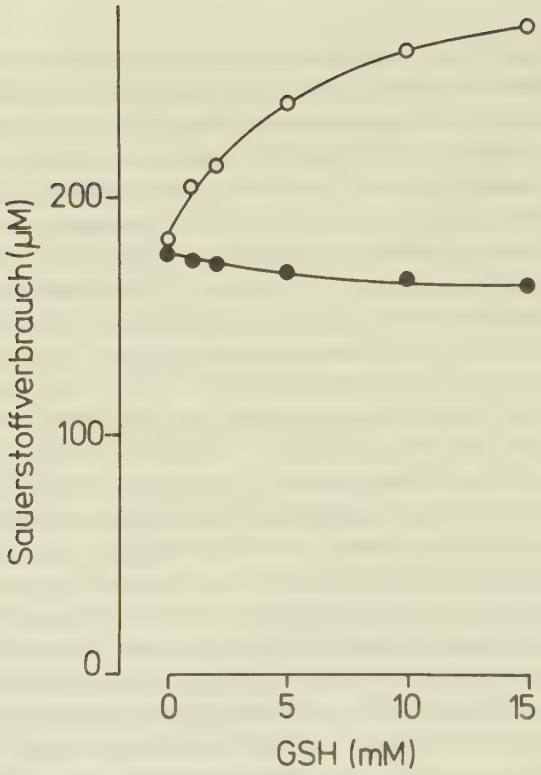


Abbildung 22. Abhängigkeit des Sauerstoffverbrauchs während der Xanthin-Oxidation von der GSH-Konzentration.
Die Punkte geben die Differenz zwischen der Sauerstoffkonzentration zu Beginn und am Ende der Xanthin-Oxidation ohne (o) und mit(●) Superoxiddismutase (40 µg/ml) wieder. Bedingungen wie in Abbildung 21, die Sauerstoffbegasung erfolgte vor der Inkubation, Xanthin: 400 µM.

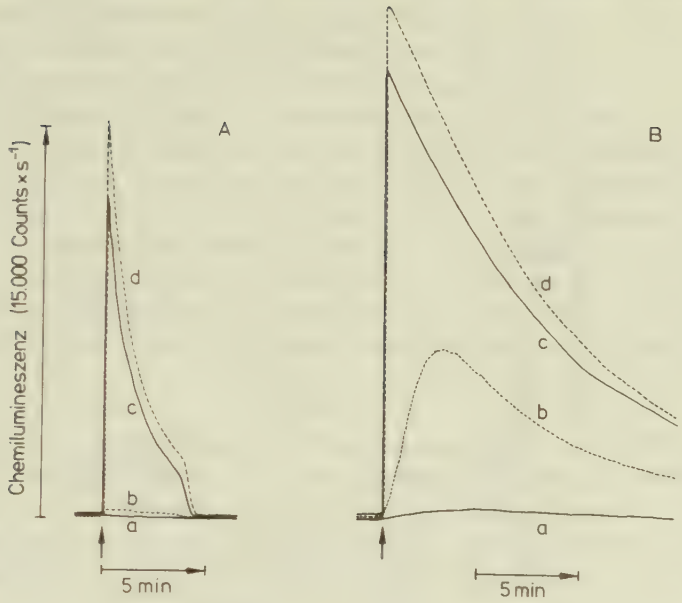


Abbildung 23. Zeitlicher Verlauf der Chemilumineszenz der Xanthinoxidase/Xanthin-(A) und der Xanthinoxidase/Acetaldehyd-Reaktion(B). Die Pfeile geben den Zeitpunkt der Zugabe des Enzyms (30 mU/ml) zu sauerstoffgesättigtem Phosphatpuffer pH 7,0 wieder.
Xanthin: 500 µM, Acetaldehyd: 5 mM.
(a): Chemilumineszenz im roten Bereich des Spektrums (>620 nm)
(b): Chemilumineszenz im gesamten sichtbaren Spektrum
(c): Wie (a) plus GSH (5 mM)
(d): Wie (b) plus GSH (5 MM)

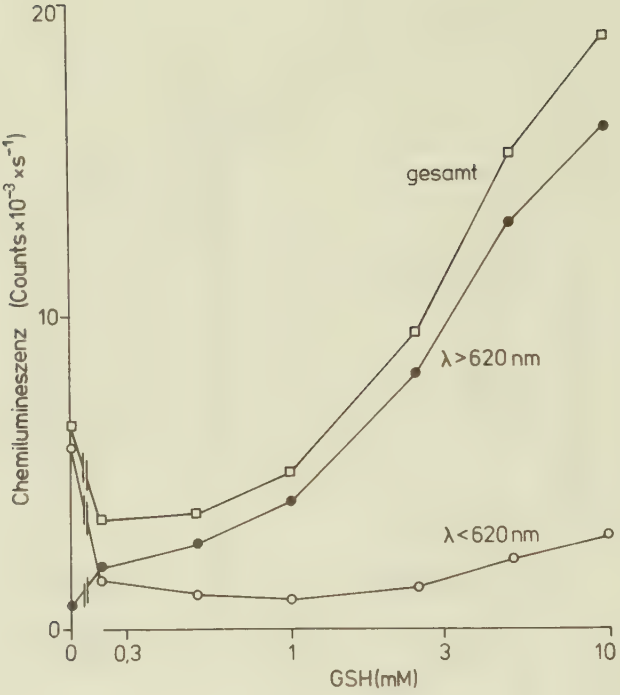


Abbildung 24. Erhöhung der roten Chemilumineszenz ($\lambda > 620$ nm) und Hemmung der nicht-roten Lichtemission durch GSH.
Bedingungen: Chemilumineszenz wurde nach Zugabe von Xanthinoxidase (30 mU/ml) zu sauerstoffgesättigtem Phosphatpuffer pH 7,0 mit 5 mM Acetaldehyd und den angegebenen Konzentrationen von GSH gegeben. Die Messungen wurden mit (●) und ohne (□) Wratten-Gelatine-Filter (620 nm) durchgeführt. Die Werte für $\lambda < 620$ nm sind die Differenzen der Werte mit und ohne Filter.

Eine Hemmung der Chemilumineszenz eines Xanthinoxidase/Xanthin-Systems durch GSH wurde auch von Videla (1983) beschrieben. Da die dort benutzte Meßappparatur im roten Bereich nicht empfindlich ist, ist dies in Übereinstimmung mit oben beschriebenen Ergebnissen.

Abbildung 25 zeigt die Abhängigkeit der Chemilumineszenz von der Aktivität der Xanthinoxidase, d.h. bei unterschiedlichen Konzentrationen des Superoxids. Während ohne GSH bereits bei geringen Konzentrationen des Enzyms ($\leq$ 1 mU/ml) Chemilumineszenz auftrat, trat in Gegenwart von GSH erst oberhalb von 1mU/ml Lichtemission auf, sodaß im Hinblick auf die Entstehung angeregter Moleküle bei Steady States des Superoxids unterhalb bestimmter Grenzwerte von einer Schutzfunktion des GSH gesprochen werden kann. Bei höheren Enzymkonzentrationen ist wieder die in Abbildung 23 bereits gezeigte höhere Chemilumineszenz in Gegenwart von GSH zu sehen.

Auch mit Mercaptoäthanol anstelle von GSH zeigte sich Chemilumineszenz im roten Bereich, allerdings im Vergleich zu GSH (17.030 Counts x s^{-1}) mit einer deutlich geringeren Intensität (5.880 Counts x s^{-1}). Demgegenüber zeigten Penicillamin, Cystein und GSSG, alle bei einer Konzentration von 5 mM, keine erhöhte Lichtemission bzw.sogar einen geringeren Wert als Kontrollen ohne diese Substanzen.

Die spektrale Verteilung der Superoxid-abhängigen Chemilumineszenz in Gegenwart von GSH ist in Abbildung 26 gezeigt. Lichtemission findet, abgesehen von unbedeutenden relativen Maxima bei etwa 420, 480 und 590 nm fast ausschließlich im Bereich oberhalb von 620 nm statt. Die Grenzen der Aussagefähigkeit dieses Spektrums wurden bereits angesprochen, bei den hier untersuchten Reaktionen sollten deshalb zusätzliche Informationen mit Hilfe von Interferenzfiltern gewonnen werden. Dies war bei der relativ hohen Intensität der Lichtemission auch möglich. Da hier insbesondere die Frage nach einer Beteiligung des Singulettsauerstoffes von Interesse ist, wurde die relative Lichtemission bei den für die Dimolemission des $^1O_2$ charakteristischen Wellenlängen 634 und 703 nm mit der Intensität bei einer dazwischen liegenden Wellenlänge (668 nm) verglichen. Tabelle VI zeigt für das Xanthinoxidase/Acetaldehyd-System und für die Chemilumineszenz bei der Autoxidation eines Hydrochinons den

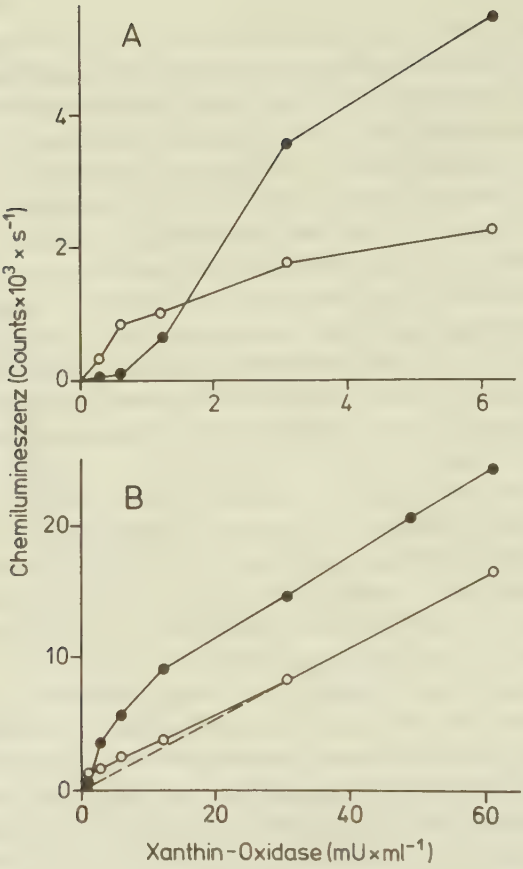


Abbildung 25. Chemilumineszenz der Xanthinoxidase/Acetaldehyd-Reaktion in Abhängigkeit von der Xanthinoxidase-Aktivität. Chemilumineszenz wurde im gesamten Spektrum mit (•) und ohne (o) GSH (5 mM) gemessen.
A: 0 - 6 mU/ml Xanthinoxidase, B: 0 - 60 mU/ml Xanthinoxidase.

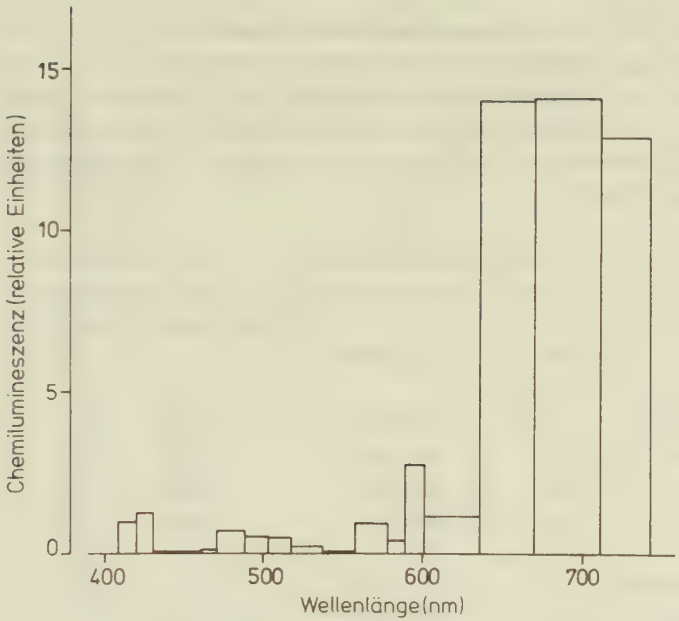


Abbildung 26. Spektrale Verteilung der Chemilumineszenz des Xanthinoxidase/Acetaldehyd-Systems in Gegenwart von GSH (5 mM). Xanthinoxidase: 30 mU/ml, Acetaldehyd: 5mM, 0,1 M Phosphatpuffer pH 7.0, mit O_2 gesättigt.
Das Histogramm gibt die durchschnittliche Lichtintensität in den Wellenlängenintervallen an, die durch die jeweiligen spektralen Durchlässigkeitsgrenzen der Filter gegeben sind.

Tabelle VI. Relative Intensität der GSH- und $O_2^{-\cdot}$-abhängigen Chemilumineszenz bei 634, 668 und 703 nm.

Bedingungen für das Xanthinoxidase-System wie in Abb. 26, für das nichtenzymatische System der $O_2^{-\cdot}$-Erzeugung wie in Abb. 17.
Die Werte sind hinsichtlich der Transmission der jeweiligen Filter korrigiert; die relativen Werte sind außerdem für die unterschiedliche spektrale Empfindlichkeit des Photomultipliers bei der jeweiligen Wellenlänge korrigiert.

System	Filter (nm)	Chemilumineszenz (Counts/s)	Relative Intensität
Xanthinoxidase/ Acetaldehyd	---	19400±1950	---
	634	940± 87	0,27
	668	480± 104	0,16
	703	3880± 31	1,00
Autoxidation des Menadiol-GSH-Konjugates	---	12200± 364	---
	634	670± 80	0,26
	668	280± 52	0,13
	703	2930± 96	1,00

Vergleich der Lichtemission bei 634, 668 und 703 nm, wobei in beiden Systemen die Lichtemission bei 634 und 703 nm deutlich höher ist als bei 668 nm.

Die Effekte von DABCO und Azidionen können als weiteres Kriterium für die Beteiligung von $^1O_2$ herangezogen werden: DABCO als Verstärker

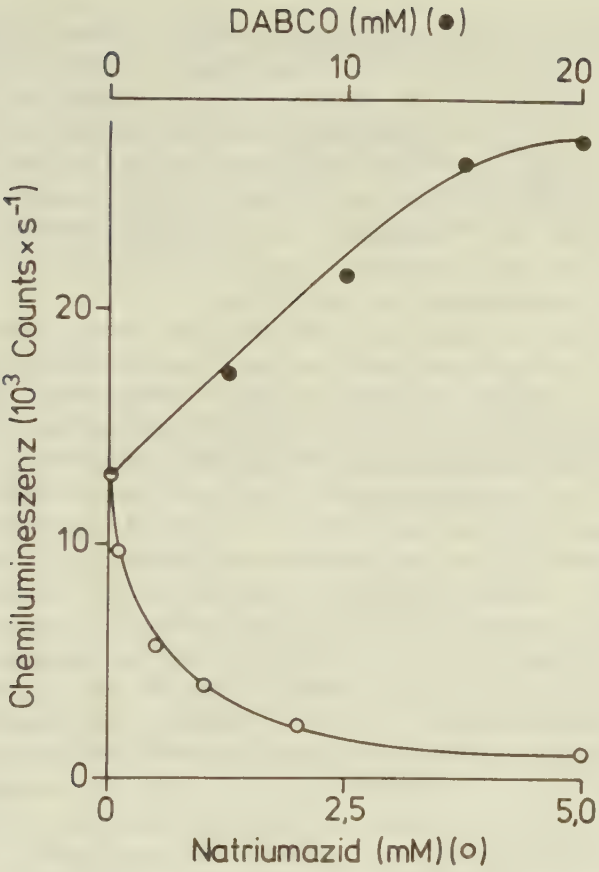


Abbildung 27. Effekt von DABCO und Natriumazid auf die Chemilumineszenz (>620 nm) des nichtenzymatischen Systems der Superoxiderzeugung in Gegenwart von GSH (5 mM). Bedingungen wie in Abb. 26.

der $^1O_2$-abhängigen Lichtemission zeigte bei einer Konzentration von 20 mM einen Anstieg der Chemilumineszenz um etwa 30%. Dieser Anstieg war jedoch nicht der Konzentration des DABCO proportional und ist relativ gering, verglichen etwa mit dem Effekt, der in Abbildung 27 für das Hydrochinon-Autoxidationssystem beschrieben wird. Dies ist jedoch durch eine direkte Hemmung der Xanthinoxidase durch DABCO zu erklären, welche auch bei Messungen des Sauerstoffverbrauchs bei der Acetaldehydoxidation festzustellen war. Natriumazid, ein Singulettsauerstoffquencher, bewirkte bei einer Konzentration von 10 mM eine Hemmung der GSH-abhängigen Chemilumineszenz um mehr als 90%.

Auch das oben beschriebene nichtenzymatische System der Superoxiderzeugung wurde im Hinblick auf Superoxid-abhängige Chemilumineszenz in Gegenwart von GSH untersucht. Zugabe von reduziertem Menadion-Glutathion-Konjugat zu sauerstoffgesättigtem Puffer bewirkte in Gegenwart von GSH Chemilumineszenz, die von der Konzentration des GSH abhängig war. Die Messungen wurden durchgeführt wie unter Abbildung 17 beschrieben, allerdings ohne FeEDTA, d.h. unter Bedingungen, bei denen in Abwesenheit von GSH keine Chemilumineszenz auftrat. Wie in Tabelle VI aufgeführt, bewirkt die Gegenwart von GSH unter den dort beschriebenen Bedingungen Lichtemission von über 12.000 counts/s. Die spektrale Verteilung ist identisch mit dem in Abbildung 26 für die Acetaldehydoxidation beschriebenen Histogramm, ebenfalls stimmt die relative Intensität der Lichtemission bei 634, 668 und 703 nm sehr gut mit den Werten des Xanthinoxidase/Acetaldehyd-Systems in Gegenwart von GSH überein (Tab. VI). Mercaptoäthanol und Cystein anstelle des GSH zeigten einen ähnlichen Effekt: Die Chemilumineszenz betrug 5.070 bzw. 1.290 counts/s.

Die Effekte von DABCO und Natriumazid sind in Abbildung 27 wiedergegeben und stellen ebenfalls ein wesentliches Indiz für die Beteiligung von Singulettsauerstoff an der Lichtemission dar.

4.2.7. Hemmung der GSH-abhängigen Chemilumineszenz

Sowohl bei der Superoxidbildung mit Hilfe der Xanthinoxidase als auch bei der Hydrochinon-Autoxidation wurde die Chemilumineszenz voll-

ständig durch Superoxiddismutase unterdrückt, jedoch nicht durch Katalase oder OH·-Quencher wie Formiat oder Mannitol (Tab. VII). Dies zeigt, daß das Superoxid $O_2^{-\cdot}$ bzw. $HO_2^{\cdot}$, jedoch nicht H_2O_2 oder OH· für die Chemilumineszenz in Gegenwart von GSH verantwortlich sind. EDTA zeigte in niedrigen Konzentrationen (50 µM) keinen Effekt auf die Lichtemission, demgegenüber bewirkte es bei 1 mM eine Hemmung von etwa 20 %. In Gegenwart von Fe^{3+} (50 µM) betrug die Chemilumineszenz ca. 60 % des Vergleichswertes ohne Fe^{3+}.

Tabelle VII. Beeinflussung der Chemilumineszenz Superoxid-produzierender Systeme in Gegenwart von GSH durch Superoxiddismutase, Katalase und OH·-Quencher.
Bedingungen wie in Tabelle VI.

Zusätze	Chemilumineszenz	
	Xanthinoxidase/ Acetaldehyd	Autoxidation des Menadion-GSH-Konjugates
	(Counts/s)	
keine	17030 (100)	11120 (100)
Katalase (30 µg/ml)	16930 (97)	11270 (97)
Superoxiddismutase (10 µg/ml)	250 (1,5)	100 (2,5)
Formiat (10 mM)	16520 (97)	9860 (89)
Mannitol (20 mM)	16890 (99)	10090 (91)

Interessanterweise zeigte Glutathionperoxidase einen deutlichen Effekt auf die Lichtemission. Halbmaximale Hemmung trat bei etwa 3 µg/ml auf. Dies kann nicht durch einen erhöhten Verbrauch von GSH erklärt werden, da auch nach den Inkubationen die GSH-Konzentration über 4 mM war. Dieses Ergebnis ist vor allem insofern überraschend, als Katalase keinen Effekt zeigt. Es ist deshalb die Beteiligung eines organischen Hydroperoxids in Betracht zu ziehen, allerdings kann auch nicht ausgeschlossen werden, daß die Glutathionperoxidase in anderer Form die Steady-State-Konzentration aktiver Sauerstoffmetaboliten beeinflußt.

4.2.8. Zum Mechanismus der Reaktion des Superoxids mit GSH

Die Reaktion zwischen $O_2^{-\cdot}$ bzw. $HO_2^{\cdot}$ und GSH wurde durch die verringerte Cytochrom c-Reduktion in Gegenwart von GSH nachgewiesen (Abb. 20). Wie in Abbildung 21 gezeigt, wird GSH in Superoxid-produzierenden Systemen zu GSSG oxidiert. Der dramatische Effekt von Superoxiddismutase sowie das Auftreten des GSSG auch in Gegenwart von Katalase zeigt deutlich, daß diese Oxidation von $O_2^{-\cdot}$ abhängig ist und nicht durch andere Sauerstoffspezies wie z. B. H_2O_2 hervorgerufen wird. Messung der Urat-Entstehung zeigte, daß die enzymatische Xanthinoxidation unter den gewählten Bedingungen mit und ohne GSH sowie mit und ohne Superoxiddismutase identisch ist, d.h. es kann davon ausgegangen werden, daß die beschriebenen Effekte nicht auf eine Enzymbeeinflussung zurückzuführen sind.

Bei der Betrachtung des Sauerstoffverbrauchs sind folgende Reaktionen in Betracht zu ziehen:

Eine Reaktion des Superoxids mit GSH (Reaktion 12) tritt an Stelle der Dismutationsreaktion (Reaktion 1). Während in Reaktion (12) ein mol $HO_2^{\cdot}$ zu einem mol H_2O_2 umgesetzt wird, ist dies in Reaktion (1) nicht der Fall: 1 mol $HO_2^{\cdot}$ wird umgesetzt zu 0,5 mol H_2O_2 und 0.5 mol O_2, d.h. 50% werden als molekularer Sauerstoff wieder freigesetzt. Ersetzen der Reaktion (1) durch Reaktion (12) führt also zu einer verringerten Wiederfreisetzung des Sauerstoffs und damit zu einer Erhöhung des Netto-

Sauerstoffverbrauchs um den Faktor 2.

Unter den in Abbildung 21 beschriebenen Bedingungen werden etwa 120 µM GSSG gebildet. Die Entstehung von 1 mol GSSG entspricht der Reaktion von 2 mol GSH mit 2 mol $HO_2^{\cdot}$ und der Bildung von 1 mol H_2O_2, d.h. einem Mehrverbrauch von 1 mol O_2. In Gegenwart von Katalase ist dieser Wert zu halbieren, da aus dem gebildeten H_2O_2 wieder O_2 freigesetzt wird. Als Nettomehrverbrauch ist also zu erwarten: 0,5 x 120 µM = 60 µM. Tatsächlich wurde in Gegenwart von GSH 97µM O_2 mehr verbraucht als in entsprechenden Versuchen ohne GSH (322µM). Da die gemessenen GSSG-Werte relativ stark schwankten, kann diese Diskrepanz auf Meßungenauigkeiten zurückzuführen sein. Allerdings ist es auch möglich, daß andere sauerstoffverbrauchende Reaktionen zusätzlich beteiligt sind. In Frage kommt hier die Bildung eines weiteren Oxidationsproduktes des GSH, wie z.B. der Glutathionsulfonsäure (GSO_3H) als einem Produkt aus Folgereaktionen des Peroxisulfenylradikals (siehe Reaktionsgleichung 13, S.59 sowie Gleichungen 14 und 15, S.78). Der Nachweis der Glutathionsulfonsäure als einem stabilen Endprodukt konnte jedoch bisher nicht eindeutig geführt werden.

Bei der Chemilumineszenz der Reaktion von $O_2^{-\cdot}$ mit GSH handelt es sich um Lichtemission, die durch den bimolekularen Übergang von Singulettsauerstoff in den Grundzustand hervorgerufen wird. Dies wird durch die spektrale Verteilung (Abb. 26, Tab. VI) sowie durch die Effekte von DABCO und Azid gezeigt. Der Effekt von Superoxiddismutase zeigt die direkte Abhängigkeit der $^1O_2$-Entstehung von $O_2^{-\cdot}$; das Fehlen eines Effektes von Katalase und $OH^{\cdot}$-Quenchern weist darauf hin, daß H_2O_2 und $OH^{\cdot}$ keine Rolle bei der Lichtemission in Gegenwart von GSH spielen (Tab. VII). Das Ergebnis, daß GSH-abhängige Chemilumineszenz sowohl im Xanthinoxidase-System als auch bei der nichtenzymatischen $O_2^{-\cdot}$-Entstehung bei der Autoxidation eines Hydrochinons auftritt und ähnliche Eigenschaften bezüglich Katalase, Superoxiddismutase und Mannitol sowie hinsichtlich der spektralen Verteilung besitzt, weist darauf hin, daß Singulettsauerstoff eine Folge der Superoxidentstehung an sich ist und unabhängig ist von der Art der Entstehung des $O_2^{-\cdot}$.

Die Ergebnisse legen einen Mechanismus nahe, der über die Reaktio-

nen (12), (11) und (13) (S.59) zum GSOO· führt. Dieses Sauerstoffadditionsprodukt ist wahrscheinlich ein Peroxysulfenylradikal; dies wurde für ein Additionsprodukt von Cystein und O_2 von Al-Thannon et al. (1974) diskutiert und für Mercaptoäthanol von Jayson et al. (1971) ebenfalls vorgeschlagen. Dieses Peroxyradikal führt nun verschiedene Reaktionen durch, zu nennen sind neben Umlagerungsreaktionen insbesondere H-Abstraktion, z.B. von GSH, (Reaktion 14) sowie Terminationsreaktionen (Reaktion 15).

$$GSOO^{\cdot} + GSH \longrightarrow GSOOH + GS^{\cdot} \qquad (14)$$

$$GSOO^{\cdot} + R^{\cdot} \longrightarrow \text{nichtradikalische Folgeprodukte} \qquad (15)$$

Dabei kann R· für GS·, GSOO· und $O_2^{-\cdot}$ bzw. $HO_2^{\cdot}$ stehen, welche in dem benutzten System alle auftreten. Die Entstehung von nichtradikalische Peroxysulfenylspezies wurde unter anderen Bedingungen (nichtwässrige Systeme) nachgewiesen. Oae et al. (1981) zeigten, daß nach Reaktion von $O_2^{-\cdot}$ mit verschiedenen schwefelhaltigen Verbindungen als Produkte

$$R\text{-}S\text{-}O\text{-}O^{-},\ R\text{-}\overset{\overset{O}{\|}}{S}\text{-}O\text{-}O^{-} \text{ und } R\text{-}\overset{\overset{O}{\|}}{\underset{\underset{O}{\|}}{S}}\text{-}O\text{-}O^{-}$$

auftraten. Diese wurden als Intermediärprodukte bei der Entstehung von Sulfinaten und Sulfonaten vorgeschlagen. Eine Vielzahl von möglichen Reaktionsmechanismen wird von Oae et al. (1981) diskutiert.

Auch wenn die Bedingungen in den dort untersuchten Systemen von den hier gewählten verschieden sind, ist ein derartiger Reaktionsmechanismus, der über Thiylradikale, aber auch Peroxysulfenylradikale wieder zum Disulfid führt, wahrscheinlich. Möglicherweise kann dieser Mechanismus über ein Hydroperoxid auch zu Sulfinaten und Sulfonaten führen. Als Quelle für die $^1O_2$-Chemilumineszenz sind Terminationsreaktionen wie z.B.

$$GSOO^{\cdot} + GSOO^{\cdot} \longrightarrow GSSG + 2\ O_2 \qquad (16)$$

zu nennen, wobei O_2 hier als $^1O_2$ auftreten kann.

5. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Schwerpunkte behandelt:

1.) Beschreibung der Chemilumineszenz der perfundierten Rattenleber und isolierter Hepatocyten unter Bedingungen oxidativer Belastung durch Menadion. In diesem Teil wurde menadionabhängige Chemilumineszenz als Folge zellulären Redox-Cyclings dargestellt und gezeigt, daß der Metabolismus dieses Chinons mittels Messung der ultraschwachen Chemilumineszenz qualitativ beschrieben werden kann; darüberhinaus wurden unter Benutzung dieser Methode die Bedeutung der NAD(P)H-Chinon-Reduktase, der UDP-Glucuronyltransferase und der Sulfotransferase im Hinblick auf zelluläres Redox-Cycling untersucht.

2.) Als ein möglicher Mechanismus für die $^1O_2$-Entstehung als Folge erhöhter $O_2^{-}\cdot$-Produktion wurde eine $O_2^{-}\cdot$-abhängige, $^1O_2$-Chemilumineszenz emittierende Modellreaktion beschrieben, welche in dieser oder ähnlicher Form auch in der Zelle ablaufen kann. Es wurde gezeigt, daß die Entstehung von $^1O_2$ als direkte Folge von $O_2^{-}\cdot$ (z.B. über Dismutationsreaktionen) nicht wahrscheinlich ist.

5.1. Chemilumineszenzmessungen am perfundierten Organ, an isolierten Hepatocyten und Mikrosomenfraktionen als eine Methode zur qualitativen Erfassung des Menadionmetabolismus.

Der Metabolismus des Menadions, wie er in Abbildung 1 schematisch wiedergegeben ist, zeigt einerseits den toxischen Weg der 1-Elektronen-Reduktion zum Semichinon mit darauffolgender $O_2^{-}\cdot$-Bildung, andererseits einen Schutzmechanismus, der aus (a) der NAD(P)H-Chinon-Reduktase, (b) der UDP-Glucuronyltransferase und (c) der PAPS-Sulfotransferase besteht und der Umwandlung des hydrophoben Chinons in wasserlösliche Konjugate, welche die zelluläre Ausscheidung ermöglichen, zum Ziel hat. Als ein weiterer Mechanismus ist die im Schema nicht gezeigte Konjugationsreaktion mit GSH zu nennen, die nichtenzymatisch (siehe Nickerson et al.,1963) oder enzymatisch mit Hilfe der Glutathion-S-Transferase

erfolgen kann.

Chemilumineszenz der perfundierten Leber als auch isolierter Hepatocyten ist als Folge der Ein-Elektronen-Reduktion des Menadions mit nachfolgender $O_2^{-\cdot}$-Bildung anzusehen. Dies wird durch sämtliche im Folgenden diskutierten Ergebnisse unterstützt: Bei Konzentrationen oberhalb von etwa 10 µM bewirkt Menadion Lichtemission. Diese ist strikt sauerstoffabhängig und ist mit einem O_2-Mehrverbrauch verbunden, welcher durch Redox-Cycling des Menadions und der damit verbundenen Sauerstoffreduktion erklärt wird. Der in Tabelle I gezeigte Anstieg des GSSG bei Absinken des GSH ist eine Folge der H_2O_2-Entstehung, wobei dieses über die Glutathionperoxidase (Reaktion 3) unter GSH-Verbrauch und GSSG-Entstehung zu H_2O reduziert wird. Die Summe des oxidierten und reduzierten Glutathions bleibt nicht konstant, da oxidiertes Glutathion sowie das Menadion-Glutathion-Konjugat ausgeschieden werden. Die Erhöhung des $NADP^+$-Spiegels, welche die Oxidation des zellulären NADPHs zu $NADP^+$ widergibt, wird hervorgerufen durch Reduktion eines Teils des entstandenen GSSG mit Hilfe der Glutathionreduktase; darüberhinaus erfolgt das Redox-Cycling auf Kosten von NADPH, wie u.a. durch die im Kapitel 4.6. beschriebenen Ergebnisse nahegelegt wird. Der Verlauf der Konzentrationsabhängigkeit der Chemilumineszenz mit einer Sättigung oberhalb von etwa 60 µM (Abb. 4A) ist im Einklang mit der Annahme, daß auch die Ein-Elektronen-Reduktion im Wesentlichen enzymatisch erfolgt und damit geschwindigkeitslimitiert ist. Das dafür verantwortliche Enzym kann z.B. die NADPH-Cytochrom P450-Reduktase sein, für welches diese Fähigkeit in vitro nachgewiesen ist (Iyanagi und Yamazaki, 1974). Auch die Fähigkeit mikrosomaler Fraktionen, in Gegenwart von Menadion und NADPH, jedoch kaum mit NADH, Chemilumineszenz zu erzeugen, weist auf die Beteiligung der NADPH-Cytochrom P450-Reduktase hin.

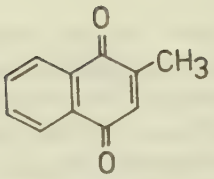
Der sigmoide Verlauf der Konzentrationsabhängigkeit (Abb. 4A) deutet darüberhinaus auf einen Schutzmechanismus, welcher bis zu einer gewissen Menadionkonzentration die Chemilumineszenz unterbinden kann. Diese Grenzkonzentration (ca. 10 µM) ist in Übereinstimmung mit der Konzentrationsabhängigkeit toxischer Effekte, wie sie bei Thor et al.(1982)

beschrieben werden. Als entscheidendes Element in diesem Mechanismus wurde die NAD(P)H-Chinonreduktase nachgewiesen; eine Hemmung dieses Enzyms führte zu einer deutlichen Erhöhung der Toxizität des Menadions. Chemilumineszenzmessungen (Abb. 7,8,9,10, Tab. IV) zeigen ebenfalls einen deutlich positiven Effekt der Hemmung dieses Enzyms auf die menadionabhängige Lichtemission. Darüberhinaus ist in Gegenwart von Dicoumarol, einem Inhibitor dieses Enzyms, im Gegensatz zu Kontrollbedingungen, kein sigmoider Verlauf der Chemilumineszenz in Abhängigkeit von der Menadionkonzentration mehr zu erkennen (Abb. 10), d.h. auch geringe Konzentrationen bewirken einen Anstieg der Chemilumineszenz als Folge des Redox-Cyclings. Der oben erwähnte Schutzmechanismus ist offenbar bei Hemmung der NAD(P)H-Chinonreduktase nicht mehr funktionsfähig.

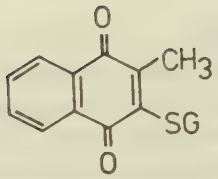
Ausgehend von der Annahme, daß die NAD(P)H-Chinon-Reduktase eine wesentliche Funktion bei der Minimierung zellulären Redox-Cyclings und der damit auftretenden Bildung angeregter Moleküle wie $^1O_2$ besitzt, lag es nahe zu überprüfen, ob eine Induktion dieses Enzyms einen gegenteiligen Effekt zeigt.

Es wurde gezeigt, daß Induktion der NAD(P)H-Chinon-Reduktase durch Vorbehandlung mit BHA eine Verringerung des menadionabhängigen Redox-Cyclings bewirkte. Dieser Effekt konnte durch den Inhibitor Dicoumarol wieder aufgehoben werden (Abbildungen 9 u.10). Auch die für die Lichtemission erforderliche kritische Konzentration ist deutlich zu höheren Konzentrationen verschoben. Die genau entgegengesetzten Effekte von Induzierung des Enzyms einerseits und dessen Hemmung andererseits im Hinblick auf Schwellenkonzentration und absolute Höhe der Chemilumineszenz stellen einen starken Beweis für die Schutzfunktion der NAD(P)H-Chinon-Reduktase gegen die toxischen Effekte des Chinon-Redox-Cyclings dar. Insbesondere schließt die vollständige Aufhebung des induzierten Schutzeffektes durch Dicoumarol aus, daß andere, durch die Vorbehandlung beeinflußte Parameter im untersuchten Zusammenhang von Bedeutung sind.

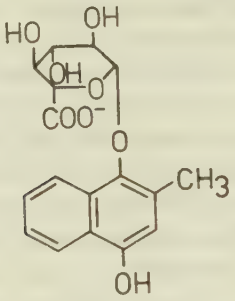
Die als weitere Elemente von Entgiftungsmechanismen genannten Schritte Glucuronidierung und Sulfatierung beeinflussen ebenfalls das Ausmaß des chinonabhängigen Redox-Cyclings. Es wurde gezeigt, daß sowohl eine Hemmung der UDP-Glucuronyltransferase als auch eine Hemmung der



Menadion



Menadion-GSH-Konjugat



Menadiol Glucuronid

Abbildung 28. Strukturformeln des Menadions, des Menadion-GSH-Konjugats und des Glucuronids. Während die ersten beiden Verbindungen Chinoncharakter haben, liegt beim Glucuronid eine aromatische Verbindung vor.

PAPS-Sulfotransferase zu einer Erhöhung der Lichtemission führen. Offenbar ist die NAD(P)H-Chinon-Reduktase-abhängige Reduktion des Chinons zum Hydrochinon nicht ausreichend, um Redox-Cycling vollständig zu verhindern. Möglicherweise ist das Hydrochinon auch in der Zelle in der Lage, - allerdings sicherlich in geringerem Umfang als das Semichinonradikal - Elektronen auf O_2 zu übertragen. Auch eine stationäre Konzentration des Semichinonradikals, welches von der Konzentration des Hydrochinons über die Reaktion

$$Q + QH_2 \longleftrightarrow 2\ QH^{\bullet} \qquad (17)$$

abhängt, ist in Erwägung zu ziehen. (Q: Chinon, $QH^{\bullet}$:Semichinon, QH_2:

Hydrochinon).

Es wird deutlich, daß das Umsetzen des Hydrochinons zum Glucuronid und Sulfat nicht nur die Exkretion erleichtert, sondern darüberhinaus ein Schritt ist, der direkt auf das Redox-Cycling des Chinons wirkt. Die chemische Struktur der Verbindung wird derart geändert, daß sie nicht mehr durch Redoxreaktionen zum Chinon oxidiert werden kann. Hier liegt ein Unterschied zu der Konjugation eines Chinons mit GSH: Das GSH-Konjugat ist nach wie vor in der Lage, Redox-Cycling durchzuführen, wie in Untersuchungen an mikrosomalen Fraktionen gezeigt werden konnte. Dabei ist davon auszugehen, daß auch für die Reduktion des Menadion-Glutathion-Konjugates die NADPH-Cytochrom P450-Reduktase verantwortlich ist. Die Konjugation mit GSH stellt also an sich keine Entgiftungsreaktion dar. Durch den Vergleich der in Abb.28 dargestellten Strukturformeln wird deutlich, daß das Glucuronid, im Gegensatz zu Menadion und zu dem Menadion-Glutathion-Konjugat keine chinoide Verbindung ist oder als solches zum Chinon oxidiert werden kann. Allerdings kann nicht nur bei der Glucuronidierung und Sulfatierung, sondern auch bei der Bildung des GSH-Konjugats insofern von einem Schutzmechanismus gesprochen werden, als die Erhöhung der Wasserlöslichkeit hydrophober Substanzen deren Exkretion erleichtert.

Die beschriebenen Erhöhung der Chemilumineszenz bei Hemmung der NAD(P)H-Chinonreduktase, der UDP-Glucuronyltransferase und der PAPS-Sulfotransferase ist also eine Folge eines gestörten Schutzmechanismus, welcher zelluläres Redox-Cycling dadurch unterdrückt, daß Chinone in eine Verbindung überführt werden, die den Redox-Cyclus Chinon/Semichinon nicht mehr durchführen können. Die Konjugationsreaktion mit GSH leistet dies offenbar nicht. Der negative Effekt der Phoron-Vorbehandlung auf die Chemilumineszenz, wie er in Abbildung 5A gezeigt ist, kann in diesem Sinne, allerdings auch durch andere Funktionen des GSH erklärt werden (siehe unten). Chemilumineszenz als Folge zellulären Redox-Cyclings tritt also dann auf, wenn obengenannte physiologische Entgiftungsmechanismen überlastet bzw. gehemmt sind. Die Toleranz der Zelle gegenüber Menadion kann durch Induktion dieser Entgiftungsmechanismen, hier gezeigt für die NAD(P)H-Chinon-Reduktase, erhöht werden.

5.2. Zum Mechanismus der Chemilumineszenzentstehung

Es wurde gezeigt, daß in Superoxid-produzierenden Modellsystemen, wie z.B. bei der Autoxidation eines Hydrochinons keine Chemilumineszenz gemessen werden konnte, solange sich keine katalytisch wirksamen Komplexe wie FeIII-EDTA in der Lösung befanden (Kap.4.2.1.). Darüberhinaus besitzt die Chemilumineszenz in Gegenwart von Fe-EDTA sowie die Chemilumineszenz des Xanthinoxidase-Systems mit Xanthin oder Acetaldehyd als Substrat völlig andere spektrale Eigenschaften als die an der perfundierten Leber gemessene Lichtemission. Dies wird deutlich durch den Vergleich der Spektren der Abbildung 4 und der Abbildung 19 sowie den Vergleich des prozentualen Anteils des roten Lichtes in der Xanthinoxidase-Reaktion mit dem der Organperfusion. Die Chemilumineszenz in diesen Modellsystemen ist nicht nur von $O_2^{-\cdot}$, sondern auch von H_2O_2 und $OH^{\cdot}$ abhängig. Diese hier zusammengefaßten Ergebnisse schließen weitgehend aus, daß die am Organ gemessene Chemilumineszenz auf Reaktionen zurückzuführen ist, wie sie in den obengenannten Modellsystemen auftreten und als Ursache für die dort beschriebene Lichtemission diskutiert werden. Das heißt, insbesondere sind die nichtenzymatische Dismutation des Superoxids (Reaktion 1) sowie Reaktionen des $O_2^{-\cdot}$ mit H_2O_2 (Reaktion 4) oder mit $OH^{\cdot}$-Radikalen weitgehend auszuschließen.

Offensichtlich ist für die Entstehung der Chemilumineszenz eine weitere Reaktion mit zellulären Bestandteilen erforderlich. Es wurde eine Reaktion beschrieben, welche hinsichtlich spektraler Verteilung der Lichtemission mit der Organchemilumineszenz übereinstimmt und als möglicher Mechanismus für das Auftreten dieser Chemilumineszenz zu diskutieren ist. Es wurde gezeigt, daß das Superoxidanionradikal mit Glutathion, einem Tripeptid, welches in Zellen in einer Konzentration von 5-10 mM vorliegt, reagiert. Dabei reichte eine Konzentration von 2,2 mM aus, um 50% des im Modellsystem erzeugten Superoxids wegzufangen (Abbildung 20). Bei dieser Reaktion wird GSH zu GSSG oxidiert. Singulettsauerstoff, $^1O_2$, konnte ebenfalls als Produkt nachgewiesen werden. Als Mechanismus wird die Bildung eines Thiylradikals mit anschließender Sauerstoffaddition zumPeroxysulfenylradikal angenommen, wobei letzteres

in Terminationsreaktionen $^1O_2$ freisetzt.

Es gibt Hinweise dafür, daß diese Reaktionen bei der menadioninduzierten Chemilumineszenz des perfundierten Organs eine Rolle spielen: Die spektrale Verteilung der Lichtemission dieser Modellreaktion stimmt weitgehend mit der spektralen Verteilung der Organchemilumineszenz überein, wie durch Vergleich der Spektren in den Abbildungen 26 und 4 zu sehen ist, außerdem unterstützt der Effekt der Phoron-Vorbehandlung diese Annahme (siehe Abb.5A). Auch die Tatsache, daß es keiner weiteren Folgeprodukte des $O_2^{-\cdot}$, wie H_2O_2 oder $OH^{\cdot}$, bedarf, läßt ein Auftreten dieser Reaktion in der Zelle als möglich erscheinen.

Allerdings muß gesagt werden, daß die Rolle des Glutathions bei der Organ- und Zellchemilumineszenz äußerst komplex ist, da neben der direkten Reaktion des GSH mit $O_2^{-\cdot}$ folgende Reaktionen zu berücksichtigen sind: (1) Menadion reagiert mit GSH zum Menadion-GSH-Konjugat, welches ebenfalls in der Lage ist, Redox-Cycling durchzuführen, wie in Kapitel 4.1.3. gezeigt wurde. (2) Bei dieser Reaktion wird, wie von Nickerson et al. (1963) gezeigt wurde, nichtumgesetztes Menadion reduziert. Dies bedeutet, daß hier Reduktionsäquivalente freiwerden, die auf O_2 übertragen werden können und somit ebenfalls $O_2^{-\cdot}$ und Folgeprodukte erzeugen können. (3) GSH spielt eine Rolle als Coenzym bei der Glutathionperoxidase-Reaktion (Reaktion 3), was im Hinblick auf die H_2O_2-Entstehung und insbesondere auch im Hinblick auf den enzymatischen Abbau organischer Peroxide von Bedeutung ist, welcher, im Gegensatz zum radikalischen Abbau, nicht mit der Bildung angeregter Spezies einhergeht.

Bei der Frage nach der biologischen Relevanz der direkten Reaktion des bei Redox-Cycling entstehenden Superoxids mit GSH ist zu berücksichtigen, daß in der Zelle Schutzmechanismen, hier insbesondere die Superoxiddismutase, mit GSH effektiv konkurrieren. Wenn man als Größenordnung für die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante des GSH mit $HO_2^{\cdot}$ die gleiche annimmt, wie sie für Cystein und $HO_2^{\cdot}$ mit 600 $M^{-1}xs^{-1}$ bestimmt wurde (Bielski und Shiue, 1979), und als Wert für die Reaktion des Superoxids mit der Superoxiddismutase $k=1 \times 10^9$ M^{-1} (Fridovich,1983), ergibt sich unter Berücksichtigung der etwa 1000-fach höheren Konzentration des GSH im Vergleich zur Konzentration der Superoxiddismutase ein

immer noch etwa 3000-fach höherer Umsatz über das Enzym. Geht man jedoch davon aus, daß die durch Redox-Cycling entstandenen $O_2^{-}\cdot$-Radikale zumindest unter bestimmten Bedingungen, wie z.B. bei erhöhter Produktionsrate oder innerhalb globulärer Proteine etc. nicht völlig von zellulären Schutzmechanismen wie der Superoxiddismutase eliminiert werden können, so sind folgende Aspekte zu berücksichtigen:

Reaktionen mit dem zellulären GSH sind wahrscheinlich. In welchem Umfang diese ablaufen, ist schwierig abzuschätzen. Es ist jedoch denkbar, daß ein Teil des während des Redox-Cyclings entstehenden GSSG Folge einer solchen Reaktion ist.

Neben der Reaktion mit GSH, die hier gezeigt wurde, und der Reaktion mit Cystein, die von Bielski und Shiue (1979) beschrieben wurde, ist eine Reaktion des Superoxids mit SH-Gruppen, insbesondere von Proteinen, möglich. Dieser bisher kaum berücksichtigte Mechanismus könnte Ursache für eine Vielzahl toxischer Effekte sein, die im Zusammenhang mit Redox-Cyclern auftreten. Vor allem eine Schädigung von Enzymen mit funktionellen SH-Gruppen sollte zu weitreichenden toxischen Wirkungen führen. Die im Vergleich zu anderen zellulären Bestandteilen wie z.B. Lipiden relativ hohe Reaktivität von $HO_2\cdot$ mit SH-Gruppen könnte eine Erklärung dafür darstellen, daß bei einigen Redox-Cyclern zwar eine relativ hohe Cytotoxizität gefunden wird, dies jedoch nicht oder nur sehr unbefriedigend mit Lipidperoxidation, welche in vielen Systemen mit einer oxidativen Belastung einhergeht, korreliert werden kann. Zum Beispiel gibt es für Paraquat sehr widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich der Lipidperoxidation (siehe Trush et al., 1981 sowie Cadenas et al., 1983). Für Menadion wurde gezeigt, daß es mikrosomale Lipidperoxidation nicht nur nicht verstärkt, sondern sehr effektiv unterbindet (Wills, 1972), ein Ergebnis, welches eindeutig bestätigt werden konnte (nicht gezeigt). Auch im Vergleich zu dem in einigen Publikationen vorgeschlagenen Erklärungsmodell für die Toxizität von Redox-Cyclern, welches den übermäßigen Verbrauch von Reduktionsäquivalenten als entscheidend annimmt, erscheint die Schädigung von Protein- und insbesondere Enzym-SH-Gruppen plausibel. Zumindest ist eine Beteiligung dieser Reaktionen an toxischen Effekten anzunehmen.

Reaktionen des Superoxids mit SH-Gruppen können zur Entstehung angeregter Spezies wie $^1O_2$ führen, deren Reaktivität diejenige des Superoxids übersteigt. Allerdings sind die dazu erforderlichen Terminationsreaktionen zweiter oder höherer Ordnung im Hinblick auf die beteiligten Sauerstoffspezies, während es sich bei der Reaktion von Superoxidradikalen mit SH-Gruppen um Reaktionen erster Ordnung handelt. Dies bedeutet, wie es auch in Abbildung 25 gezeigt ist, daß eine Entstehung angeregter Spezies nicht linear mit der Superoxid-Produktionsrate einhergeht, sondern bei geringer $O_2^{-\cdot}$-Bildung vernachlässigbar gering ist, während sie mit einer Erhöhung des $O_2^{-\cdot}$ überproportional ansteigt.

Grundsätzlich ist jedoch hervorzuheben, daß erstmalig gezeigt wurde, daß mit dem Auftreten von RS$^{\cdot}$-Radikalen bei hinreichend hohen O_2-Partialdruck Folgereaktionen ablaufen, die zur Entstehung angeregter Spezies wie $^1O_2$ führen.

Von Bartoli et al. (1980) wurde gezeigt, daß die zelluläre Superoxiddismutaseaktivität in untersuchten Tumor-Zellstämmen deutlich niedriger ist als in Kontrollzellen. Hier liegen Möglichkeiten, mittels geeigneter Redox-Cycler selektive Toxizität hervorzurufen. Die von Thornalley et al. (1984) beschriebene selektive Toxizität des 1-Naphthols für Tumorzellen deutet bereits darauf hin, da als Wirkmechanismus die mikrosomale Umsetzung des 1-Naphthols zu einem Dihydroxynaphthalin angenommen wird, welches nach Oxidation zum Naphthochinon Redox-Cycling durchführen kann.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Menadioninduzierte Chemilumineszenz der perfundierten Rattenleber, isolierter Hepatocyten und isolierter Mikrosomenfraktionen ist eine Folge des Redox-Cyclings zwischen Menadionsemichinon und Menadion und der dabei entstehenden Superoxidradikalen. Mit Hilfe der Messung der ultraschwachen Chemilumineszenz können direkt, kontinuierlich und nicht-invasiv qualitative Aussagen über den Metabolismus dieses Chinons gewonnen werden.

In Konkurrenz zu der 1-Elektron-Reduktion in der Zelle sind als Schutzreaktionen die 2-Elektronenreduktion des Chinons zum Hydrochinon mit Hilfe der NAD(P)H-Chinon-Reduktase sowie die darauffolgende Glucuronidierung und/oder Sulfatierung des Hydrochinons zu nennen. Hemmung der NAD(P)H-Chinon-Reduktase, der UDP-Glucuronyltransferase und der PAPS-Sulfotransferase führt zu einer Erhöhung des Redox-Cyclings und der damit verbundenen Chemilumineszenz; Induktion eines dieser Enzyme, gezeigt für die NAD(P)H-Chinon-Reduktase, führt zu einer Verringerung des Redox-Cyclings, d.h. zu einer erhöhten Toleranz der Zelle gegenüber Menadion.

Die Bildung des Glutathionkonjugats erhöht zwar die Wasserlöslichkeit des Chinons und erleichtert damit die zelluläre Ausscheidung, stellt jedoch an sich keinen Schutz gegen Redox-Cycling dar, da es, wie das Menadion selbst, Redox-Cycling durchführen kann.

Da die relative Bedeutung des giftenden und des entgiftenden Reaktionsweges von der Aktivität der jeweiligen Enzyme abhängt, kann eine Verschiebung im Redoxstatus der erforderlichen Coenzyme ebenfalls die Toxizität beeinflussen. Es wurde gezeigt, daß eine Limitierung des zellulären NADPHs durch Hemmung der Transhydrogenase und eine Erhöhung des Verfügbaren NADHs durch Blockierung der Atmungskette zu einer Verringerung des Redox-Cyclings führt.

Die Entstehung von Singulettsauerstoff, $^1O_2$, ist als Ursache für die beschriebene Organchemilumineszenz wahrscheinlich. Es kann weitgehend ausgeschlossen werden, daß die Lichtemission eine direkte Folge der Dismutation oder einer Reaktion des Superoxids mit dessen Folgeprodukten

H_2O_2 oder $OH^{\cdot}$ ist. Vielmehr ist eine Reaktion mit anderen zellulären Bestandteilen anzunehmen.

Superoxidradikale, wie sie bei Redox-Cycling entstehen, reagieren mit GSH. Als Reaktionsprodukt wurde in Modellsystemen das Disulfid, GSSG nachgewiesen. Bei der Reaktion von GSH mit $O_2^{-\cdot}$ bzw. $HO_2^{\cdot}$ entsteht darüberhinaus in Modellsystemen Singulettsauerstoff, $^1O_2$. Es wird damit erstmalig das Auftreten angeregten Sauerstoffs als Folge der Reaktion eines Thiols mit einem Sauerstoffradikal beschrieben. Ein vorgeschlagener Mechanismus beinhaltet die Bildung von Thiylradikalen und die Addition molekularen Sauerstoffs. Es gibt Hinweise dafür, daß die $^1O_2$-Chemilumineszenz dieser Reaktion an der Chemilumineszenz der perfundierten Leber und isolierter Hepatocyten beteiligt ist.

Eine direkte Reaktion des Superoxids nicht nur mit GSH, sondern auch mit Protein-SH-Gruppen, z.B. mit funktionellen SH-Gruppen von Enzymen ist denkbar. Dies stellt einen bisher wenig diskutierten Mechanismus der sauerstoffabhängigen Toxizität von Redox-Cyclern dar.

LITERATURVERZEICHNIS

Akerboom, T.P.M. und Sies, H. (1981). In: Methods in Enzymology (Jacoby, W.B. Hrsg.), Bd. 77, 373-382, Academic Press, New York.

Al-Thannon, A.A., Barton, J.P., Packer, J.E., Sims, R.J., Trumbore, C.N. und Winchester, R.V. (1974). Intern. J. Radiat. Phys. Chem. 6, 233-248.

Bartoli, G.M., Bartoli, S., Galeotti, T. und Bertoli, E. (1980). Biochem. Biophys. Acta 620, 205-211.

Barton, J.P. und Packer, J.E. (1970). Int. J. Radiat. Phys. Chem. 2, 159-166.

Benson, A.M., Cha, Y.-N., Bueding, E., Heine, H.S. und Talalay, P.(1979). Cancer Res. 39, 2971-2977.

Benson, A.M., Hunkeler, M.J. und Talalay, P. (1980). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5216-5220.

Bielski, B.H.J. (1978). Photochem. Photobiol. 28, 645-649.

Bielski, B.H.J. und Richter, H.W. (1977). J. Am. Chem. Soc. 99, 3019-3023.

Bielski, B.H.J. und Shiue, G.G. (1979). Ciba Found. Symp. 65. 43-48.

Brown, J.P. (1980). Mutat. Res. 75, 243-277.

Burke, M.D., Vadi, H., Jernström, B. und Orrenius, S. (1977). J. Biol. Chem. 252, 6424-6431.

Cadenas, E., Brigelius, R. und Sies, H. (1983). Biochem. Pharmacol. 32, 147-150.

Cadenas, E. und Chance, B. (1981). Biophys. J. 33,2, 184a.

Cadenas, E. und Sies, H. (1983). Methods Enzymol. 105, 221-231.

Cadenas, E., Wefers, H. und Sies, H. (1981). Eur. J. Biochem. 119, 531-536.

Cadenas, E., Wefers, H., Müller, A., Brigelius, R. und Sies, H. (1982). In: Agents and Actions Supplements, Bd. 11, 203-216 (M.J. Parnham und J. Winkelmann, Hrsg.) Birkhäuser Verlag, Basel.

Calam, D.H. und Waley, S.G. (1962). Biochem. J. 85, 417-419.

Cohen, G.M., Wilson, G.D., Gibby, E.M., Smith, M.T., d'Arcy Doherty, M. und Connors, T.A. (1983). Biochem Pharmacol. 32, 2363-2365.

d'Arcy Doherty, M., Cohen, G.M. und Smith, M.T. (1984). Biochem Pharmacol. 33, 543-549.

Dutton, G.J. und Burchell, B. (1977). Prog. Drug Metab. 2, 1-70.

Ernster, L. (1967). Methods Enzymol. 10, 309-317.

Fasco, M.J. und Principe, L.M. (1982). Biochem. Biophys. Res. Commun. 104, 187-192.

Foote, C.S. (1976). In: Free Radicals in Biology (Pryor, W.A. Hrsg.), Bd. 2, 85-113.

Foote, C.S., Shook, S.C. und Abakerli, R.A. (1980). J. Am. Chem. Soc. 102, 2503-2504.

Fox, M.A. und Olive, S. (1979). Science 205, 582-583.

Fridovich, I. (1983). Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 23, 239-257.

Gebicki, J.M. und Bielski, B.H.J. (1981). J. Am. Chem. Soc. 103, 7020-7022.

Hoffman, M.Z. und Hayon, E. (1972). J. Am. Chem. Soc. 94, 7950-7957.

Iyanagi, T. und Yamazaki, I. (1970). Biochim. Biophys. Acta 216, 282-294.

Jayson, G.G., Stirling, D.A. und Swallow, A.J. (1971). Intern. J. Radiat. Biol. 19, 143-156.

Kappus, H. und Sies,H. (1981). Experientia 37, 1233-1241.

Kellogg, E.W. und Fridovich, I. (1975). J. Biol. Chem. 250, 8812-8817.

Khan, A.U. (1970). Science 168, 476-467.

Klingenberg, M. (1974). In: Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H.U., Hrsg.), 2094-2108, Verlag Chemie, Weinheim.

Kosower, N.S. und Kosower, E.M. (1978). Int. Rev. Cytol. 54, 109-160.

Krijgsheld, K.R., Frankena, H., Scholtens, E., Zweens, J. und Mulder, G.J. (1979). Biochim. Biophys. Acta 586, 492-500.

Levin, D.E., Hollstein, M., Christman, M.F., Schwiers, E.A. und Ames, B.N. (1982). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 7445-7449.

Lind, C., Hochstein, P. und Ernster, L. (1982). Arch. Biochem. Biophys.

216, 178-185.

Losito, R., Owen, C.A. und Flock, E.V. (1967). Biochemistry 6, 62-68.

Mayeda, E.A. und Bard, A.J. (1974). J. Am. Chem. Soc. 96, 4023-4024.

McCay, P.B., Floyd, R.A., Lai, E.K., Poyer, J.L. und Fong, K.L. (1976).Biophys. J. 16, 66a.

McCord, J.M. und Day, E.D.Jr. (1978). FEBS Lett. 86, 139-142.

McCord, J.M. und Fridovich, I. (1969). J. Biol. Chem. 244, 6049-6055.

McNeil, C.J., Banford, J.C., Brown, D.H. und Smith, W.E. (1981). FEBS Lett. 133, 175-177.

Moore, H.W. und Czerniak, R. (1981). Med. Res. Revs. 1, 249-280.

Morimoto, K., Wolff S. und Koizumi, A. (1983). Mutat. Res. Lett. 119, 355-359.

Nickerson, W.J., Falcone, G. und Strauss, G. (1963). Biochemistry 2, 537-543.

Oae, S., Takata, T. und Kim, Y.H. (1981). Bull. Chem. Soc. Jpn. 54, 2712-2723.

Powis, G., Svingen, B.A. und Appel, P. (1981). Mol. Pharmacol. 20, 387-394.

Powis, G. und Appel, P. L. (1980). Biochem. Pharmacol. 29, 2567-2572.

Poyer, J.L. und McCay, P.B. (1971). J. Biol. Chem. 246, 263-269.

Pryor, W.A., Hales, B.J., Prenovic, P.J. und Church, D.F. (1982). Science 220, 425-427.

Quintiliani, M., Badiello, R., Tamba, M., Esfandi, A. und Gorin, G. (1977). Int. J. Radiat. Biol. 32, 195-202.

Reed, D.J., Babson, J.R., Beatty, P.W., Brodie, A.E., Ellis, W.W. und Potter, D.W. (1980). Anal. Biochem. 106, 55-62.

Russell, G.A. (1957). J. Am. Chem. Soc. 79, 3871-3877.

Schäfer, K., Bonifacic, M., Bahnemann, D. und Asmus, K.-D. (1978). J. Phys. Chem. 82, 2777-2780.

Schuetzle, D. (1983). Environ. Health Perspect. 47, 65-80.

Sies, H. (1978). In: Methods in Enzymology (Fleischer, S. und Packer, L. Hrsg.), Bd. 52, 48-59, Academic Press, New York.

Sies, H., Brigelius, R. und Akerboom, T.P.M. (1983). In: Functions of Glutathione-Biochemical, Physiological, Toxicological and Clinical Aspects (Larsson,A., Orrenius, S., Holmgren, A. und Mannervik, B. Hrsg.), 51-64, Raven Press, New York.

Sies, H. und Großkopf, M. (1975). Eur. J. Biochem. 57, 513-520.

Smith, M.T., Evans, C.G., Thor, H. und Orrenius, S. (1984). In: Oxidative Stress (Sies, H. Hrsg.), Academic Press, in Druck.

Smith, M.T., Thor, H., Hartzell, P. und Orrenius, S. (1982). Biochem. Pharmacol. 31, 19-26.

Stauff, J., Schmidkunz, H. und Hartmann, G. (1963). Nature 198, 281-282.

Strauss, G., Falcone, G. und Nickerson, W.J. (1963). Biochemistry 2, 543-546.

Thomson, R.H. (1971). "Naturally Occuring Quinones" Academic Press, London und New York.

Thor, H., Smith, M.T., Hartzell, P., Bellomo, G., Jewell, S.A. und Orrenius, S. (1982). J. Biol. Chem. 257, 12419-12425.

Thornalley, P.J., d'Arcy Doherty, M. Smith, M.T., Bannister, J.V. und Cohen, G.M. (1984). Chem.-Biol. Interact. 48, 195-206.

Trush, M.A., Mimnaugh, E.G., Ginsburg, E. und Gram, T.E. (1981). Toxicol. Appl. Pharmacol. 60, 279-286.

Videla, L. A. (1983). Experientia 39, 500-502.

Wahlländer, A. und Sies, H. (1979). Eur. J. Biochem. 96, 441-446.

Wahlländer, A., Soboll, S. und Sies, H. (1979a). FEBS Lett. 97, 138-140.

Wills, E.D. (1972). Biochem. Pharmacol. 21, 1879-1883.

Younes, M. und Siegers, C.P. (1981). Chem. Biol. Interactions 34, 257-266.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Physiologische Chemie I der Universität Düsseldorf durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Sies für die Betreuung der Arbeit, die Überlassung des Arbeitsplatzes und für die stete Unterstützung dieses Projekts.

Herrn Prof. Dr. Riesner danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Herrn Dr. E. Cadenas danke ich für die Einweisung in theoretische und methodische Grundlagen der Chemilumineszenzmessung.

Besonders danken möchte ich Frau U. Rabe für technische Assistenz, insbesondere für die Präparation der benötigten Mikrosomenfraktionen, außerdem für die Anfertigung der Abbildungen.

Ein Teil dieser Arbeit wurde im Rahmen des Schwerpunktes "Mechanismen toxischer Wirkungen von Fremdstoffen" von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

Lebenslauf

Am 11. April 1953 wurde ich in Krefeld geboren als Sohn der Eheleute Werner und Katharina Wefers, geb. Suren.

Von 1959 bis 1962 besuchte ich die kath. Volksschule in Krefeld-Oppum, ab Frühjahr 1962 das Fichte-Gymnasium in Krefeld. Am 17. Mai 1971 bestand ich dort die Abiturprüfung.

Ab Wintersemester 1971 studierte ich in Aachen an der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule; das Studium beendete ich am 7. Dezember 1977 mit dem bestandenen 1. Staatsexamen für das höhere Lehramt mit den Fächern Physik und Biologie.

Nach einer Beschäftigung als angestellter Lehrer am Maria-Sibylla-Merian-Gymnasium in Krefeld (Februar 1978 - August 1978) wurde ich Studienreferendar am Bezirksseminar Krefeld. Am 29. Februar legte ich die Prüfung für das II. Staatsexamen für das Lehramt an Gymnasien ab. Von August 1980 bis Januar 1981 war ich als Studienrat z.A. an der Städtischen Gesamtschule Köln-Rodenkirchen tätig.

Seit Februar 1980 bin ich mit Margret Bonny-Wefers, geb. Bonny, verheiratet; wir haben eine Tochter.

Im März 1981 begann ich unter der Betreuung von Hern Prof. Dr. Helmut Sies am Institut für Physiologische Chemie I der Universität Düsseldorf mit der Bearbeitung der vorliegenden Dissertation.

FOTODRUCK J. MAINZ GmbH
Neupforte 13, Nähe Markt, D-5100 Aachen
Telefon: (0241) 27305 und (0241) 38606